Université Pierre et Marie Curie, École des Mines de Paris
& École Nationale du Génie Rural des Eaux et des Forêts

Master 2 Sciences de l'Univers, Environnement, Ecologie
Parcours Hydrologie-Hydrogéologie

Mesure en continu des nutriments en Seine : Suivi et prédiction des composés azotés en Seine

Clélie Braouezec
Directeurs de recherche : Catherine Paffoni, Vincent Rocher
Encadrant : Julien Pouillaude

SIAAP – DDP
Direction du Développement et de la Prospective
Service Expertise et Prospective
82, av. Kléber - 92 700 Colombes.

Mars-Août 2014

ABSTRACT

The Seine River is highly anthropic and is directly impacted by the greater Paris. Aware of its fragility and the necessary return to good ecological status, SIAAP has been doing weekly monitoring of the water physico-chemical quality for over 20 years.

In addition to this self-monitoring, they have a close cooperation with the LGE as part of the research program PIREN-Seine, to monitor the high frequency of the Seine. This project named CarboSeine has three in-situ multi-parameter autonomous stations downstream from the Paris area (Andrésy, Bougival and Suresnes). This will allow continuous monitoring of the parameters involved in the biogeochemical processes. This information will help to better understand these processes. A probe measuring nitrogen compounds (ammonia, nitrites, nitrates) was tested in the laboratory and in recreated real conditions before considering deploying it in the Seine. Tests showed that this probe was functional and will be tested in the Seine in 2015.

A second collaboration with the PIREN-Seine made possible to study the kinetics "in situ" of nitrification in Seine. This study focused on three different sites downstream from Paris (one upstream from the wastewater of Seine Aval (SAV) (Asnières), at the wastewater of SAV and downstream from SAV (Poissy)). The data does not give very good results. The rates of nitritation and nitratation are low, the difference of nitrite concentration during 24h is not very high and the error in the concentration measurement could be important. However, this study establishes a procedure that will allow future data study and determine several important parameters to better understand the dynamics of nitrogen compounds and their future in the Seine. This will be useful and it will help to improve the prediction of concentrations of nitrite, nitrate and ammonium in Seine.

Keywords: Water quality, Seine, Nitrogen, probe, Continuous measurement, kinetics, Nitrification

SOMMAIRE

TABLE DES MATIERES

ABSTRACT ..... **- 1 -**

SOMMAIRE ..... **- 2 -**

REMERCIEMENTS ..... **- 5 -**

INTRODUCTION GENERALE ..... **- 6 -**

PRESENTATION DU STAGE ..... **- 7 -**

I MISSIONS TECHNIQUES ..... - 7 -
I.1 Maintenances des stations de mesures ..... *- 7 -*
I.2 Mise à jour du guide technique CarboSeine ..... *- 7 -*

II MISSIONS SCIENTIFIQUES ..... - 7 -
II.1 Validation de la sonde WIZ en laboratoire et en milieu naturel ..... *- 7 -*
II.2 Détermination des cinétiques « in-situ » pour les réactions de nitrosation et nitratation dans la Seine ..... *- 8 -*

DETERMINATION DES CINETIQUES « IN SITU » POUR LES REACTIONS DE NITROSATION ET NITRATATION DANS LA SEINE ..... **- 9 -**

I RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE ..... - 9 -
I.1 Etat de l'art ..... *- 9 -*
I.1.1 Rappel sur le cycle de l'azote ..... - 9 -
I.1.2 Focus sur l'étape de nitrification ..... - 10 -
I.1.2.1 Les microorganismes mis en jeu ..... - 10 -
I.1.2.2 Les mécanismes biogéochimiques ..... - 10 -
I.1.2.3 Synthèse cellulaire ..... - 10 -
I.1.2.4 Influence des substrats et de la température sure les cinétiques ..... - 10 -
I.1.2.5 Evolution de la recherche scientifique sur les cinétiques de nitrification ..... - 12 -
I.2 Premiers essais faits au Siaap ..... *- 13 -*

II OBJECTIFS DE L'ETUDE ..... - 14 -

III MATERIEL ET METHODE ..... - 15 -
III.1 Sites de prélèvement ..... *- 15 -*
III.2 Schéma expérimental ..... *- 15 -*
III.3 Dosage des nitrites par colorimétrie ..... *- 16 -*
III.4 Traitement des données brutes ..... *- 17 -*

IV INTERPRETATION DES RESULTATS ..... - 19 -
IV.1 Stratégie de l'analyse des résultats ..... *- 19 -*
IV.2 Axe 1 : Etude des cinétiques à 20°C, détermination des taux maximum de nitrosation et nitratation ..... *- 20 -*
IV.2.1 Rejets SAV ..... - 20 -
IV.2.2 Eau de Seine Poissy ..... - 23 -
IV.2.3 Eau de Seine Asnières ..... - 25 -
IV.2.4 Bilan des résultats pour les trois sites et variations spatiale de vmax ..... - 28 -
IV.3 Axe 2 : Détermination des constantes de Michaelis-Menten ..... *- 29 -*
IV.3.1 Résultats à SAV ..... - 29 -
IV.3.2 Résultats à Poissy ..... - 29 -
IV.3.3 Résultats à Asnières ..... - 30 -
IV.3.4 Bilan des différents Km déterminés à différentes températures ..... - 30 -

IV.4 Axe 3 : Influence de la Température sur les taux maximaux ..... *- 32 -*
IV.4.1 Profils des Vitesses maximales en fonction de la température ..... - 32 -
IV.4.2 Détermination du facteur de correction Θ ..... - 33 -
IV.5 Bilan général des résultats obtenus ..... *- 36 -*

CONCLUSION GENERALE ..... **- 37 -**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ..... **- 38 -**

ANNEXES ..... **- 41 -**

RESUME ..... **- 49 -**

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : schéma simplifié du cycle de l'azote (Grouz et al., 2013) ..... - 9 -

Figure 2 : Courbe de Michaelis-Menten (vitesse d'oxydation en fonction de la concentration en substrat) ..... - 11 -

Figure 3 : Influence de la température sur la nitrification (Henze et al., 1997) ..... - 11 -

Figure 4 : Schéma expérimental ..... - 13 -

Figure 5 : Vitesse de consommation des nitrites et de production des nitrates sur différentes eaux (Le Roch, 2010) ..... - 13 -

Figure 6 : Lieux de prélèvements le long de la Seine (Siaap, 2014 modifiée) ..... - 15 -

Figure 7 : Réaction mise en jeu lors de l'expérience ..... - 16 -

Figure 8 : Photo des échantillons incubés sous agitation à l'obscurité à température ambiante - 16 -

Figure 9 : Schéma de la microplaque 96 puits à analyser ..... - 17 -

Figure 10 : Courbe de calibration de la gamme d'étalonnage ..... - 17 -

Figure 11 : Schéma récapitulatif des 3 axes d'interprétation des résultats ..... - 19 -

Figure 12 : Concentration en fonction du temps de l'échantillon témoin (A) ..... - 20 -

Figure 13 : Concentration en fonction du temps des échantillons dopés en nitrite (SAV) .. - 21 -

Figure 14 : Concentration en fonction du temps des échantillons dopés en ammonium (SAV) - 21 -

Figure 15 : Activité en fonction de la concentration à SAV ..... - 22 -

Figure 16 : Concentration en fonction du temps de l'échantillon témoin (Poissy) ..... - 23 -

Figure 17 : Concentration en fonction du temps des échantillons dopés en nitrites (Poissy) - 23 -

Figure 18 : Concentration en fonction du temps des échantillons dopés en ammonium (Poissy) - 24 -

Figure 19 : Activité en fonction de la concentration à Poissy ..... - 25 -

Figure 20 : Concentration en fonction du temps de l'échantillon témoin (Asnières) ..... - 25 -

Figure 21 : Concentration en fonction du temps des échantillons dopés en nitrite (Asnières) - 26 -

Figure 22 : Concentration en fonction du temps des échantillons dopés en ammonium (Asnières) ..... - 26 -

Figure 23 : Activité en fonction de la concentration à Asnières ..... - 27 -

Figure 24 : Variation spatiale de la vitesse maximale de nitrosation et de nitratation le long de la Seine à 20°C ..... - 28 -

Figure 25 : Activité en fonction de la concentration à SAV ..... - 29 -

Figure 26 : Activité en fonction de la concentration à Poissy .....- 29 -

Figure 27 : Activité en fonction de la concentration à Asnières.....- 30 -

Figure 28 : Variation de la constante de Michaelis de nitrosation le long de la Seine en fonction de la température.....- 31 -

Figure 29 : Variation de la constante de Michaelis de nitratation le long de la Seine en fonction de la température.....- 31 -

Figure 30 : Influence de la température sur les vitesses maximales d'oxydation pour la nitrosation pour les différents sites.....- 32 -

Figure 31 : Influence de la température sur les vitesses maximales d'oxydation pour la nitratation pour les différents sites.....- 33 -

Figure 32 : Influence de la température sur les vitesses maximales d'oxydation pour la nitrosation pour les différents sites (10-15-20°C).....- 33 -

Figure 33 : Influence de la température sur les vitesses maximales d'oxydation pour la nitratation pour les différents sites (10-15-20°C).....- 34 -

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Valeurs de Km et µmax trouvées dans la littérature.....- 12 -

Tableau 2 : Vitesses témoins pour les différents dopages (SAV).....- 20 -

Tableau 3 : Activités nitrosantes et nitratantes sans prendre en compte les témoins (SAV)- 21 -

Tableau 4 : Activités nitrosantes et nitratantes pour les différents échantillons (SAV) .....- 22 -

Tableau 5 : Vitesses témoins pour les différents dopages (Poissy) .....- 23 -

Tableau 6 : Activités nitrosantes et nitratantes sans prendre en compte les témoins (Poissy)- 24 -

Tableau 7 : Activités nitrosantes et nitratantes pour les différents échantillons (Poissy)....- 24 -

Tableau 8 : Vitesses témoins pour les différents dopages (Asnières).....- 25 -

Tableau 9 : Activités nitrosantes et nitratantes sans prendre en compte les témoins (Asnières)- 26 -

Tableau 10 : Activités nitrosantes et nitratantes pour les différents échantillons (Asnières)- 27 -

Tableau 11 : Tableau récapitulatif des vitesses maximales à 20°C .....- 28 -

Tableau 12 : Tableau bilan des paramètres Km déterminés pour les différentes températures- 30 -

Tableau 13 : Tableau bilan des paramètres vmax déterminés pour les différentes températures- 32 -

Tableau 14 : Facteurs de correction Θ pour la nitrosation et la nitratation sur les trois sites- 35 -

Tableau 15 : Tableau bilan des constantes déterminées .....- 36 -

Tableau 16 : Valeurs de constantes vmax et Km déterminées sur des eaux de Seine dans la littérature .....- 36 -

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Mode opératoire des expériences réalisées en 2010 (Le Roch, 2010) .....- 41 -

Annexe 2 : Protocole du dosage des nitrites par colorimétrie.....- 45 -

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier Monsieur Olivier Rousselot, Directeur de la DDP, pour m'avoir permis de réaliser mon stage au sein de sa Direction.

Je remercie Madame Catherine Paffoni, Ingénieur Hydrologue Divisionnaire et responsable du service « expertise et prospective : process et milieu naturel », pour m'avoir accueillie dans son équipe.

Je remercie également Monsieur Vincent Rocher, Ingénieur de Recherche pour son implication et son aide dans mes différentes études faites au sein de son équipe.

Je tiens à remercier tout particulièrement Julien Pouillaude, technicien de recherche et encadrant de mon stage. J'ai pu effectuer un stage dans de très bonnes conditions. Son implication et ses conseils m'ont énormément aidée tout au long de mon stage.

Merci également à :

Anthony Augé, ingénieur au LGE (IPGP) qui s'est beaucoup intéressé aux études que j'ai réalisées et qui m'a particulièrement aidée sur la sonde WIZ.

Céline Briand, technicienne de recherche, pour son aide lors de mes filtrations au laboratoire.

Au personnel du laboratoire de la DDP qui a réalisé mes analyses nitrites, nitrates et ammonium.

Thibaud Cazier, en thèse au laboratoire Métis (UPMC), ainsi que le personnel du laboratoire avec qui j'ai réalisé les études cinétiques.

Jean Bernier, en post-doc au SIAAP, qui a contribué au traitement des données cinétiques.

Erwan Garcia Gonzalez, technicien de recherche, pour les sorties sur le terrain sur le réseau ODES.

Valentine Grandclerc (stagiaire) et Claire Plessis (apprentie) pour les moments de pauses passés ensemble.

INTRODUCTION GENERALE

La Directive Cadre sur l'Eau de 2000 (2000/60/CE), impose d'atteindre à l'horizon 2015 « le bon état écologique » des masses d'eau superficielles sur l'ensemble du territoire européen, et donc sur la Seine. Le bassin de la Seine est classé en zone sensible selon la législation européenne et est menacé d'eutrophisation, terme désignant une pollution naturelle de certains écosystèmes aquatiques qui se produit lorsque les nutriments assimilables par les algues sont en trop grande quantité. Les principaux nutriments à l'origine de ce phénomène sont le phosphore (principalement dans sa forme soluble, le phosphate) et l'azote (principalement sous forme d'ammonium, de nitrate et de nitrite). Ces pollutions sont majoritairement dues aux rejets urbains des effluents domestiques des stations d'épurations, aux rejets industriels, lessivage des sols… Or, cette eutrophisation entraîne une dégradation des milieux aquatiques et une réduction de la biodiversité.

Grâce à des moyens techniques, humains et financiers importants, le Syndicat Interdépartemental de l'Assainissement de l'Agglomération Parisienne (SIAAP) vérifie depuis plus de vingt ans que les moyens mis en œuvre pour répondre aux attentes de cette directive sont suffisants en réalisant le suivi, grâce à son réseau d'auto-surveillance, de l'évolution de la qualité des eaux de surface recevant les rejets de ses installations, à savoir la Seine et la Marne. Ce contrôle se fait par des prélèvements et analyses hebdomadaires au laboratoire de la Direction du Développement et de la Prospective (DDP) (accrédité COFRAC) sur un certain nombre de paramètres physico-chimiques, tels que la conductivité, le pH ou encore les nutriments carbonés, azotés et phosphorés. En parallèle, le SIAAP a développé un réseau de mesure en continu de l'oxygène dissous sur 9 stations réparties entre Alfortville à l'amont de Paris et Méricourt très à l'aval du dernier point de rejet du SIAAP. Ce réseau d'Oxygène dissous en Seine (ODES) constitue un outil de surveillance très efficace et permet d'apprécier l'impact positif des aménagements réalisés ces dernières années sur les stations d'épuration et les réseaux d'assainissement. L'étude prospective menée par le SIAAP dans le but de développer des réseaux de mesures en continu, constitue l'un des grands enjeux de demain. Dans ce contexte, la Direction du Développement et de la Prospective du SIAAP a engagé en 2010, en étroite collaboration avec ses partenaires du PIREN-Seine (notamment le Laboratoire de Géochimie des Eaux (Institut de Physique du Globe de Paris)), un projet visant à développer des stations de mesures multi-paramètres. Ces stations sont développées dans le cadre du projet CarboSeine et permettront de suivre en continu la conductivité, la turbidité, la température, le pH, les algues phyto-planctoniques, le phosphate, l'azote sous ses différentes formes et différents paramètres météo. L'objectif est de développer, à partir de mesures de terrain et de modélisations, une vision d'ensemble du fonctionnement du système formé par le réseau hydrographique de la Seine, son bassin versant et la société humaine qui l'investit. Pour mieux connaître les processus existants sur le milieu naturel ou l'impact des stations sur celui-ci, des études en laboratoires sont aussi menées à la DDP, ce qui permet d'avoir une expertise sur l'efficacité des stations et sur l'impact des STEP sur la Seine pour garantir le bon état du milieu naturel. Les composés azotés étant l'une des pollutions problématiques majeures de ces dernières années, le SIAAP réalise des expériences pour mieux comprendre la dynamique du nitrite et la nitrification en Seine.

Ce stage a permis d'appréhender les différentes missions de la DDP vis-à-vis du milieu naturel : d'une part la surveillance avec les travaux sur la sonde WIZ qui permet de mesurer les différents composés azotés, d'autre part, la prospective avec l'étude des cinétiques de la nitrification.

PRESENTATION DU STAGE

I MISSIONS TECHNIQUES

I.1Maintenances des stations de mesures

L'acquisition de données de qualités à haute fréquence nécessite un suivi des différents capteurs déployés sur la Seine. Des interventions ont donc été faites pour maintenir le bon fonctionnement des stations ODES et CarboSeine. Ces interventions consistaient à faire l'entretien et la calibration si besoin de ces capteurs oxygène.

I.2Mise à jour du guide technique CarboSeine

Le guide technique est un manuel d'utilisation des stations CarboSeine. Il décrit chaque capteur avec les différentes opérations de nettoyages, de calibrations et de mesures contradictoires à réaliser. L'étude du nouveau capteur (la sonde WIZ-Systea) a permis de mettre en évidence plusieurs problèmes et leurs solutions associées. Ce capteur a été ajouté au guide technique.

II MISSIONS SCIENTIFIQUES

II.1 Validation de la sonde WIZ en laboratoire et en milieu naturel

La mise en service d'une nouvelle sonde de mesure à haute fréquence nécessite plusieurs phases de test et de validation avant d'être placée en Seine. La sonde WIZ permettant de mesurer les composés azotés, est donc en phase de test depuis 2013. Celle-ci a été corrigée en octobre 2013 par le constructeur suite à des disfonctionnements observés lors des premiers tests en laboratoire.

La phase en laboratoire 2014 a montré des résultats très satisfaisants. La sonde permet de mesurer des concentrations jusqu'à 2 mg NO_2^-/L avec une surestimation moyenne de 4%, 50 mgNO_3^-/L avec une sous-estimation moyenne de 15% et 4 mg NH_4^+/L avec une sous-estimation moyenne de 9%, soit la gamme maximale susceptible d'être rencontrée en Seine.

Ces bon résultats sont obtenus à condition qu'à chaque changement de réactifs (préparés par nos soins), la calibration soit vérifiée et si besoin, corrigée. Pour cela, on analyse deux solutions étalons pour chaque paramètre (un blanc et une concentration connue). La nouvelle densité optique moyenne des triplicatas est alors rentrée. Cependant, il faut s'assurer que la précision soit de ± 10% entre les trois triplicatas et que la justesse soit comprise dans l'intervalle ± 20% avec le précédent étalonnage.

La sonde a ensuite été testée en hall d'essai qui permet de s'approcher des conditions en Seine. Ces tests ont été concluants en donnant des résultats très satisfaisants pour les nitrites et nitrates avec une surestimation moyenne de 13% et une sous-estimation moyenne de 15% respectivement permettant de garantir l'évaluation du bon état des cours d'eau (DCE). L'ammonium semble sensible pour les concentrations inférieures à 1 mg NH_4^+/L avec une sous-estimation de 33% mais globalement la mesure reste correcte avec 13 % de sous-estimation moyenne sur toute la gamme pouvant atteindre 4 mg NH4+/L. Les pics en ammonium sont très bien mesurés.

Plusieurs problèmes techniques et de conception de la sonde ont été observés lors de ces tests. Des fuites ont été constatées avec l'utilisation du fût de réactifs (obligatoire sur le terrain). Les poches de déchets et de réserves en eau ultra-pure sont mal conçues au niveau de leur volume et de leur système de fixation. Des solutions ont été apportées lors du déploiement en hall d'essai mais elles ne sont que provisoires et ne peuvent pas être envisagées à long terme.

La sonde, donnant des résultats globalement satisfaisant en hall d'essai, va être déployée sur une des stations CarboSeine (Bougival). Ce déploiement pourra permettre de voir la robustesse de la

sonde en milieu réel où les conditions sont plus difficiles (courant, objets flottant..). Des solutions devront être trouvées pour la mise en place de la sonde sur la station. En effet, les différentes solutions apportées aux problèmes dus à la conception de la sonde et rencontrés lors de la phase en hall d'essai devront être adaptées pour le site CarboSeine de Bougival.

Cette étude a fait l'objet d'un poster et d'un rapport technique interne au SIAAP.

II.2 Détermination des cinétiques « *in-situ* » pour les réactions de nitrosation et nitratation dans la Seine

Le cycle de l'azote est un cycle biogéochimique majeur dans l'environnement, en partie régi par l'activité bactérienne. Ce cycle dans les eaux de surface est perturbé par les pollutions domestiques malgré les traitements subis par les eaux usées en station d'épuration. Ces pollutions sont d'autant plus importantes en milieu fortement anthropisé comme le bassin de la Seine. Deux réactions principales interviennent dans le cycle de l'azote : la nitrification et dénitrification (milieu anoxique). La nitrification est donc la principale réaction en Seine (milieu oxygéné sauf rares exceptions). Cette réaction transforme l'ammonium en nitrates avec en intermédiaire le nitrite qui est une forme toxique de l'azote. Les communautés bactériennes produisant du nitrite sont différentes des communautés bactériennes qui en consomment. La cinétique de ces réactions est dépendante de la température et des communautés bactériennes présentes. L'étude de la cinétique des nitrites permettra donc de mieux comprendre le milieu naturel et l'impact de la température sur différents types d'eau en Seine ainsi que de calculer les constantes de Michaelis (Km).

Cette étude a fait l'objet d'un rapport technique interne au SIAAP, d'un poster et d'un mode opératoire allant du prélèvement jusqu'à l'exploitation et le traitement des données.

Ce rapport se concentrera par la suite sur cette étude qui a permis d'obtenir une méthode de mesure des constantes Km et vmax de nitrosation et de nitratation en les déterminant pour différents sites en Seine et à différentes températures.

DETERMINATION DES CINETIQUES « IN SITU » POUR LES REACTIONS DE NITROSATION ET NITRATATION DANS LA SEINE

I RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1Etat de l'art

I.1.1 Rappel sur le cycle de l'azote

Le cycle de l'azote est un cycle biogéochimique important dans l'environnement. Il est particulièrement étudié car le nitrite, toxique pour les espèces aquatiques à faibles concentrations, intervient dans ce cycle (Lewis et Morris, 1986). Le devenir des composés azotés est donc un problème environnemental majeur. Les deux réactions principales mises en jeux sont la dénitrification et la nitrification. La colonne d'eau étant le plus souvent en aérobiose, la nitrification est le principal processus impliqué dans la dynamique du nitrite dans la Seine (Figure 1) (Cazier et al., 2014).

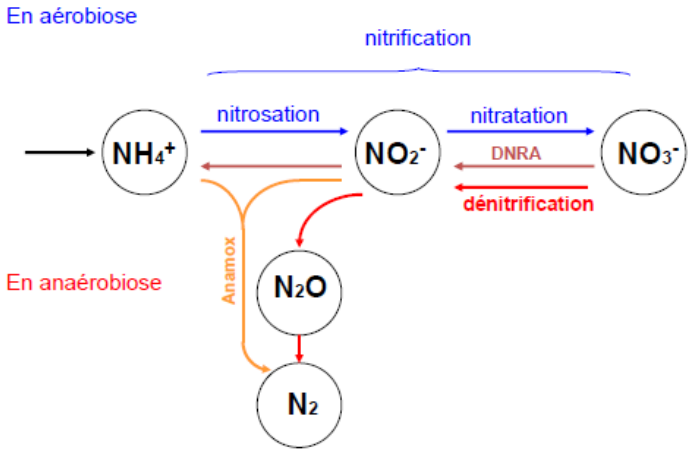

Figure 1 : schéma simplifié du cycle de l'azote (Grouz et al., 2013)

Les composés azotés en Seine proviennent de deux sources : industrielle et agricole. Les nitrates sont majoritairement issus de l'agriculture et migrent des sols vers les eaux. Les composés azotés réduits tels que l'ammonium et les nitrites proviennent majoritairement des rejets d'eaux domestiques. La station d'épuration du SIAAP Seine Aval (SAV), avec une capacité épuratoire de 1 500 000 m^3/j traite la charge ammoniacale d'abord par nitrification puis dénitrification. Cette charge a considérablement diminué la concentration en ammonium depuis 2007. Cependant, la concentration en nitrites apportée par SAV reste élevée ce qui pose un problème majeur, le nitrite étant toxique (Rocher et al., 2011). En effet, le nitrite est responsable de formations mutagènes et cancérigènes lors de la digestion et provoque des déficiences respiratoires chez les êtres vivants (Stein and Arp, 1998, Van Leeuwen, 2000). Par exemple, la maladie, Méthémoglobinémie est causée par une forte consommation de nitrates et de nitrites dans les eaux de boisson. Les nouveaux nés y sont particulièrement sensibles : « Syndrome du bébé bleu » (OMS, 2014). Il peut aussi inhiber certaines activités bactériennes et l'accumulation du Cl^- branchial chez les poissons (Philips et al., 2002). Les composés azotés peuvent aussi être responsables de développement d'algues provoquant l'eutrophisation des cours d'eau. Les algues prolifèrent en utilisant des nutriments ainsi la quantité d'azote en Seine va impacter directement la production algale (Billen et Garnier, 2009). Soucieux de la population et du milieu naturel, le devenir du nitrite en Seine est donc une question de premier ordre pour le SIAAP.

I.1.2 Focus sur l'étape de nitrification

I.1.2.1 Les microorganismes mis en jeu

La nitrification se déroule en deux étapes et met en jeu des bactéries différentes pour chaque étape. La nitrosation qui est la première étape de la nitrification est produite par les bactéries nitreuses : *Nitrosomonas europaea*, *Nitrosococcus* et *Nitrosospira*. La nitratation, deuxième étape de la nitrification est effectuée par les bactéries nitriques : *Nitrobacter winogradskyi*.

Ces bactéries sont aérobies strictes et chimiolithotrophes obligatoires. Elles utilisent l'oxydation de leurs substrats minéraux comme seule source d'énergie et le gaz carbonique comme source exclusive de carbone (Martin, 1979).

I.1.2.2 Les mécanismes biogéochimiques

Les deux mécanismes biogéochimiques mis en jeu lors de la nitrification sont des réactions d'oxydation.

Ainsi, la nitrosation s'écrit en équation de la manière suivante :

$$NH_4^+{}_{(aq)} + 3/2\ O_2 + H_2O \leftrightarrow NO_2^- + 2\ H_3O^+$$

Et la nitratation est écrite par cette équation :

$$NO_2^- + 1/2\ O_2 \leftrightarrow NO_3^-$$

Ces deux équations produisent de l'énergie : entre 276 et 351 kJ pour la nitrosation et entre 64,4 et 87,5 pour la nitratation (Martin, 1979).

I.1.2.3 Synthèse cellulaire

Grace à l'énergie produite lors de l'oxydation de l'ammonium en nitrate, la synthèse de nouvelles bactéries est possible.

Il est alors possible de prendre en compte cette synthèse dans les équations précédentes de nitrosation et nitratation (Martin, 1979).

Les équations globales prenant en compte l'oxydation et la synthèse sont donc :

$$55\ NH_4^+ + 76\ O_2 + 109\ HCO_3^- \leftrightarrow C_5H_7NO_{2\ (Nitrosomas)} + 54\ NO_2^- + 57\ H_2O + 104\ H_2CO_3$$

$$400\ NO_2^- + NH_4^+ + 4\ H2CO_3 + HCO_3^- + 195\ H_2O \leftrightarrow C_5H_7NO_{2\ (Nitrobacter)} + 3\ H_2O + 400\ NO_3^-$$

L'équation globale pour la nitrification est la suivante :

$$NH_4^+ + 1{,}83O_2 + 1{,}98HCO_3^- \leftrightarrow 0{,}021\ C_5H_7NO_2 + 1{,}041\ H_2O + 0{,}98NO_3^- + 1{,}88H_2CO_3$$

I.1.2.4 Influence des substrats et de la température sure les cinétiques

- ***Influence des Substrats***

L'évolution de la vitesse d'oxydation de l'ammonium et du nitrite suit la loi de Michaelis-Menten qui dépend de la concentration en substrat. Les cinétiques sont donc décrites par l'équation suivante :

$$v = \frac{vmax \times [S]}{Km + [S]}$$

(Équation 1)

Ainsi, il existe une relation entre la vitesse d'oxydation et la concentration en substrat. On peut alors en traçant le graphe v en fonction de [S] déterminer vmax et Km (Figure 2).

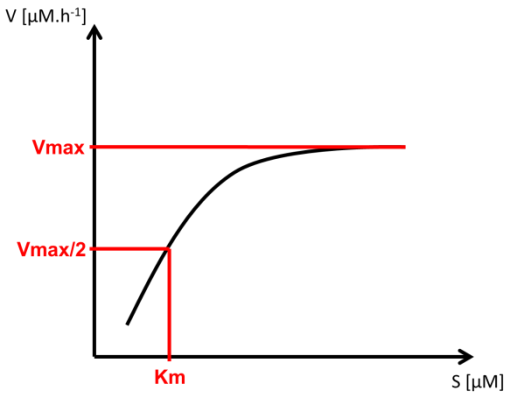

Figure 2 : Courbe de Michaelis-Menten (vitesse d'oxydation en fonction de la concentration en substrat)

Les cinétiques de diminution de l'ammonium suivent une loi d'ordre zéro, c'est-à-dire que la concentration en NH_4^+ diminue linéairement au cours du temps (Martin, 1979). Les vitesses d'oxydation de l'ammonium et du nitrite sont en effet linéaires jusqu'à 24h (Cébron, 2004).

➢ *Influence de la Température*

Les cinétiques sont dépendantes de la température. La vitesse de croissance des bactéries augmente avec la température de 10° à 22°C°, reste constantes de 30° à 35°C et diminue à partir de 35°C. Il existe donc une température optimum pour la vitesse de croissance des bactéries mise en jeu lors de la nitrification, qui est autour de 25-30°C théoriquement (Henze et al., 1997). L'évolution de la vitesse de croissance bactérienne (µmax) en fonction de la température est décrite par une loi de type Arrhenius pour des températures inférieures à la température optimum (Vigne, 2007) (Figure 3).

L'équation s'écrit : $\mu max\ (T) = \mu max\ (20°C).\ \Theta^{T-20}$ (Équation 2)

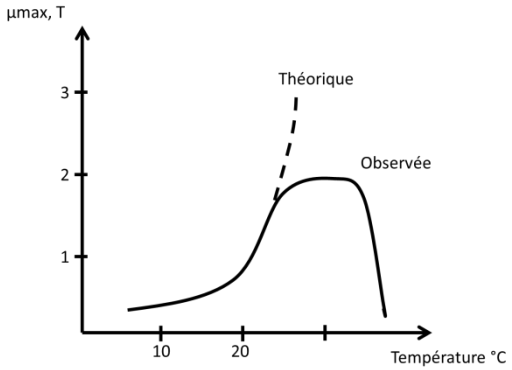

Figure 3 : Influence de la température sur la nitrification (Henze et al., 1997)

Dans la littérature, de nombreuses valeurs pour le facteur de correction de température θ sont utilisées. Elle vont de 1,02 (Oleszkiewicz et Berquist, 1988) à 1,103 (Lessouef et al., 1992; Queinnec et al., 2006).

I.1.2.5 Evolution de la recherche scientifique sur les cinétiques de nitrification

Plusieurs études ont déjà été faites sur la dynamique du nitrite dans les milieux aquatiques depuis le milieu du 20^{ième} siècle. Des études ont d'abord été réalisées pour déterminer les communautés bactériennes mises en jeux lors de la nitrification dans la Seine. Deux communautés ont été identifiées et isolées en 1890 (Winogradsky, 1890) : les Nitrobacter (oxydateurs du nitrite) et les Nitrospira (oxydateurs d'ammonium). Ces bactéries sont aujourd'hui étudiées par la méthode de Réaction en chaîne par polymérase (PCR) et très bien connues (Cébron et Garnier, 2005). Ces Communautés mises en jeux dans la nitrification étant fortement étudiées, des inhibiteurs ont été déterminés pour la nitrosation et la nitratation permettant ainsi l'étude séparée des deux réactions : l'allylthiourée pour la nitrosation et le chlorate de sodium pour la nitratation (Brion et Billen, 1998). Ces expériences ont permis d'avoir une première approche sur la cinétique du nitrite en milieu aquatique (faibles concentration en substrat et bacteries). En effet, de nombreuses études existent sur des matrices ayant de fortes populations bactériennes nitrosante et nitratante. Par exemple, l'étude de Ciudad et al., 2006, détermine les paramètres µmax et Km par les différences d'affinité pour l'oxygène lors de la nitrosation et la nitratation sur de la biomasse. Une étude a aussi étudié les cinétiques du nitrite en fonction du pH sur des boues activées (Jiménez et al, 2011). Plusieurs articles récents ont pu déterminer des µmax et Km (Tableau 1). Les publications sur l'étude des cinétiques en milieu naturel sont plus rares. Une étude a cependant été faite en 1965 par Knowles et al. sur des eaux de la Tamise. Elle a permis par suivi de la concentration en nitrite et traitement informatique de calculer des constantes Km et vmax. Les études récentes de Vilmin et al., 2013 et Raimonet et al., 2014 déterminent les activités potentielles de nitrosation et nitratation en fonction de concentration initiales différentes ce qui permet d'obtenir des Km et vmax sur des eaux de Seine du bassin parisien.

Tableau 1 : Valeurs de Km et µmax trouvées dans la littérature

		Communauté nitrosante		**communauté nitratante**	
		km	**vmax**	**km**	**vmax**
Raimonet et al., 2014	eau de Seine Asnières (20°C)	10-13 µM	0,06 µM.h^{-1}	355 µM	3,8 µM.h^{-1}
	eau de Seine Poissy (20°C)	10-13 µM	0,14 µM.h^{-1}	311 µM	5,03 µM.h^{-1}
Vilmin et al., 2013	eau de Seine (20°C)	250 µM	0,05 h^{-1}	1071µM	0,05 h^{-1}
	eau de rejet Seine Aval (20°C)	285 µM	0,065 h^{-1}	28µM	0,05 h^{-1}
Knowles et al., 1965	eau de la Tamise (15°C)	22 µM	0,008 h^{-1}	34µM	0,03 h^{-1}
Jiménez et al., 2011	boues activées			5,6µM	
Ciudad et al., 2006	biomasse d'un réacteur nitrifiant	16 µM	122 µM.h^{-1}	0,0046µM	0,01µM.h^{-1}
Hunik et al., 1993	culture cellulaire			6,2µM	

I.2Premiers essais faits au Siaap

Une étude consistant à suivre l'évolution de la concentration en nitrates, nitrites et ammonium sur différentes eaux a été réalisée en 2010 à la DDP (Le Roch, 2010). Il s'agissait d'étudier l'évolution des 3 concentrations sur un échantillon dopé en nitrite. Cet échantillon est mis dans un réacteur gardé à l'obscurité sous agitation avec une sonde pH et une sonde de conductivité (Figure 4) (Annexe 1).

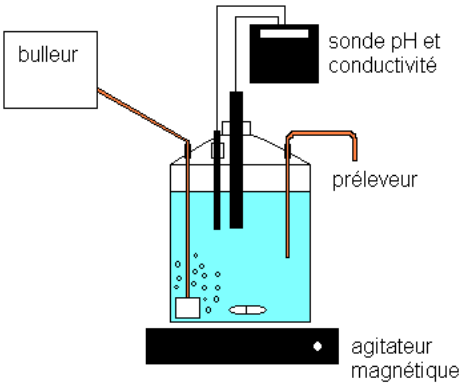

Figure 4 : Schéma expérimental

L'enjeu de cette analyse était de déterminer la capacité nitrifiante de la Seine. Ainsi, des vitesses de consommation des nitrites et des vitesses de production de nitrates ont été calculées. L'effet de la température a pu être mis en évidence avec une activité nitrifiante qui diminue avec la température. Les concentrations en nitrites et nitrates dans les eaux de rejet ne varient presque pas. Cela s'explique par les bio-filtres qui retiennent les communautés bactériennes qui se situent avant le rejet en seine (Figure 5).

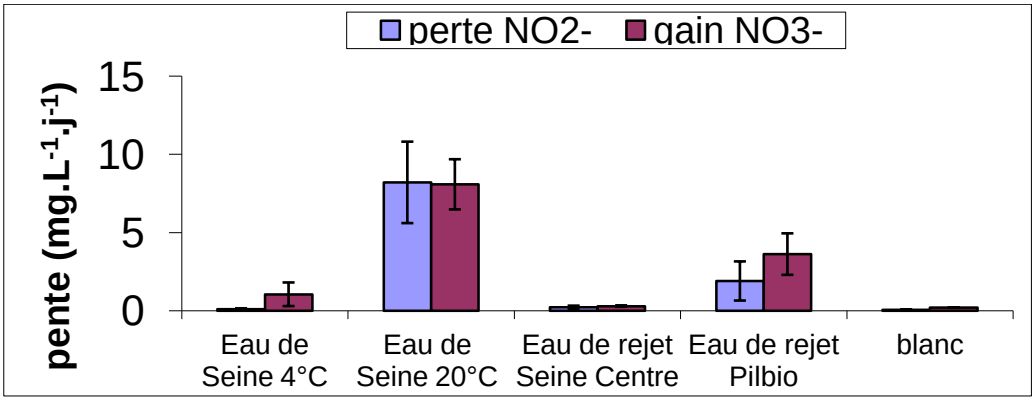

Figure 5 : Vitesse de consommation des nitrites et de production des nitrates sur différentes eaux (Le Roch, 2010)

Cette étude permet d'avoir une vision globale sur le devenir des nitrites en Seine. Mais elle ne permet pas une étude précise des deux étapes de la nitrification. Les deux étapes de la nitrification sont considérées en même temps. L'identification des différentes bactéries responsables de la nitrosation et la nitratation ont permis d'apporter des connaissances plus spécifiques sur les cinétiques mises en jeu lors de la nitrosation et la nitratation en Seine. En effet, les nouveaux protocoles utilisés permettent d'inhiber les réactions voulues pour étudier les deux réactions séparément.

II OBJECTIFS DE L'ETUDE

L'étude a pour objectif principal de suivre les 2 étapes de la nitrification séparément le long de la Seine en inhibant une des deux réactions.

Pour ceci, un mode opératoire a été mis en place :

1- suivre la concentration en nitrite au cours de temps de plusieurs échantillons dopés à plusieurs concentrations de substrats. Ainsi, la représentation des courbes de Michaelis-Menten (vitesse en fonction de la concentration en substrat) conduira à obtenir ces deux résultats importants :

- Une vitesse maximale d'oxydation « in situ » pour la nitrosation et nitratation
- Les constantes de Michaelis-Menten Km « in situ » décrivant l'affinité du milieu pour le substrat.

2- suivre l'influence de la température sur la nitrosation et la nitratation. Ainsi, la représentation de la courbe vmax en fonction de la température permettra de trouver une équation sous la forme $\mu max\ (T) = \mu max\ (20°C).\ \Theta^{T-20}$. Cette équation régit ce phénomène pour des températures inférieures à la température optimum de réaction. Elle conduira à déterminer la valeur de Θ (facteur de correction).

III MATERIEL ET METHODE

III.1 Sites de prélèvement

Les prélèvements ont été effectués sur la Seine à Poissy et à Asnières. L'eau de rejet de Seine Aval a aussi été prélevée. Trois milieux sont étudiés : un en amont de Seine Aval (Asnières) avec une communauté bactérienne différente de celle des eaux de rejet de station d'épuration, un au niveau de la station d'épuration avec une communauté bactérienne particulière et un en aval de Seine Aval. Cela permet d'évaluer l'impact de la station sur la communauté bactérienne de la Seine (Figure 6). Sur chaque site, 15L d'eau ont été prélevés et conservés à 4°C jusqu'à l'expérimentation.

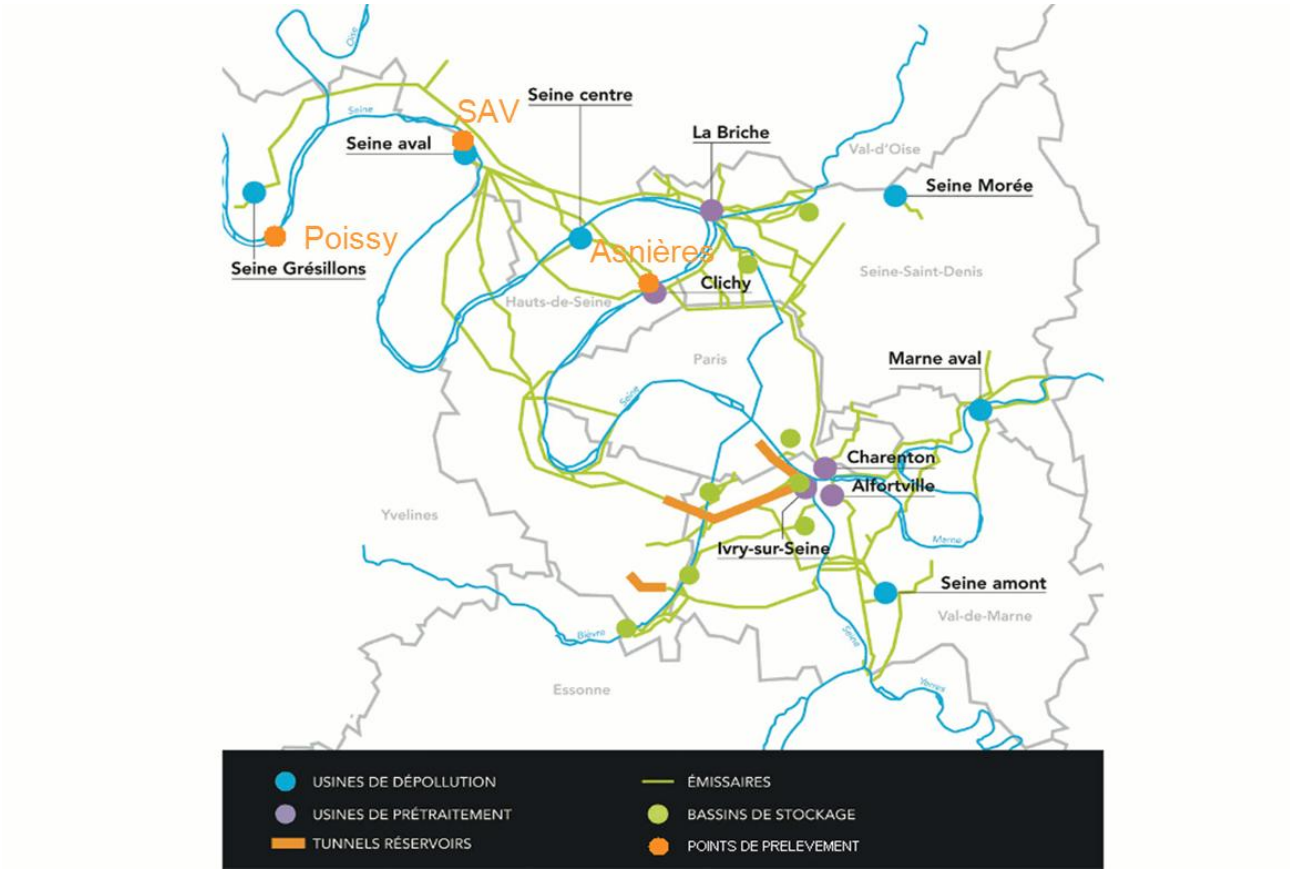

Figure 6 : Lieux de prélèvements le long de la Seine (Siaap, 2014 modifiée)

III.2 Schéma expérimental

L'expérience consiste à déterminer des activités potentielles de nitrosation et nitratation. Pour cela, on suit la concentration en nitrites dans des échantillons enrichis soit en nitrite soit en ammonium. Le schéma expérimental suivi pour les différentes températures est le suivant :

Ech. A : 1000 µM de KNO_2 + 100 µM d'allylthiourée + 500 µM de sodium chlorate => témoin
Ech. B : 100 µM de KNO_2 + 100 µM d'allylthiourée
Ech. C : 500 µM de KNO_2 + 100 µM d'allylthiourée
Ech. D : 1000 de KNO_2 + 100 µM d'allylthiourée
Ech. E : 100 µM de NH_4Cl + 800 µM de sodium chlorate
Ech. F : 500 µM de NH_4Cl + 500 µM de sodium chlorate
Ech. G : 1000 µM de NH_4Cl + 500 µM de sodium chlorate

Chaque échantillon est fait en triplicat et ceux-ci sont nommés avec les indices 1,2 et 3.

L'allylthiourée permet d'observer le potentiel de consommation des nitrites en bloquant la réaction de nitrosation. Le sodium chlorate permet d'observer le potentiel de production des nitrites en bloquant la réaction de nitratation (Figure 7).

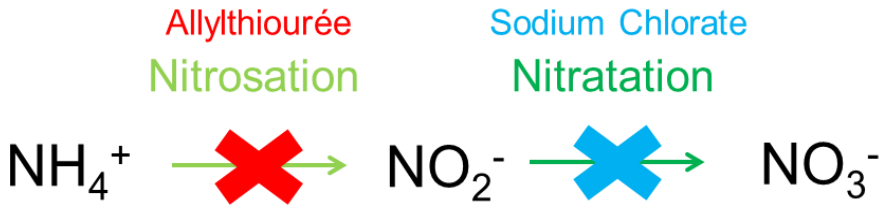

Figure 7 : Réaction mise en jeu lors de l'expérience

Les échantillons sont incubés sous agitation à l'obscurité et à température constante jusqu'à 24h (Figure 8). Pour chaque site de prélèvement, l'expérience est répétée pour des températures de 5°C, 10°C, 15°C, 20°C et 30°C pour pouvoir évaluer l'influence de la température sur les cinétiques.

Figure 8 : Photo des échantillons incubés sous agitation à l'obscurité à température ambiante

III.3 Dosage des nitrites par colorimétrie

On prélève 5 mL d'échantillon que l'on filtre à 0,45 µm. Une dilution est nécessaire pour le dosage colorimétrique suivant le dopage de l'échantillon. Ces facteurs ont été déterminés en prenant en compte la concentration du dopage et la concentration initiale en nitrite qui a été estimée grossièrement. L'objectif de ces dilutions est donc de faire retomber les concentrations de nos échantillons dans notre gamme de mesure située entre 1 et 30 µM :

- A et D : dilution 1/100 (eau de rejet SAV) 1/50 (eau de seine Poissy, Asnières)
- B : dilution 1/20 (eau de rejet SAV) 1/10 (eau de seine Poissy, Asnières)
- C : dilution 1/40 (eau de rejet SAV) 1/20 (eau de seine Poissy, Asnières)
- E, F et G : dilution 1/20 (eau de rejet SAV) 1/10 (eau de seine Poissy), pas de dilution à Asnières

Le dosage des nitrites par colorimétrie se fait suivant un protocole avec la préparation d'une gamme étalon et de réactifs (NED et SAA) (Annexe 2). Une microplaque est alors remplie avec 300 µL d'échantillon + 30µL de réactif pour être analysée (Figure 9).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	**Bl**	**Bl**	**Et1**	**Et2**	**Et3**	**Et4**	**Et5**	**Et1**	**Et2**	**Et3**	**Et4**	**Et5**
B	**A1**	**B1**	**C1**	**D1**	**E1**	**F1**	**G1**	**H1**	**I1**	**J1**	**K1**	**L1**
C	**A2**	**B2**	**C3**	**D2**	**E2**	**F2**	**G2**	**H2**	**I2**	**J2**	**K2**	**L2**
D	**A3**	**B3**	**C2**	**D3**	**E3**	**F3**	**G3**	**H3**	**I3**	**J3**	**K3**	**L3**
E	**M1**	**N1**	**O1**	**P1**	**Q1**	**R1**	**S1**	**T1**	**U1**			
F	**M2**	**N2**	**O2**	**P2**	**Q2**	**R2**	**S2**	**T2**	**U2**			
G	**M3**	**N3**	**O3**	**P3**	**Q3**	**R3**	**S3**	**T3**	**U3**			
H												

Figure 9 : Schéma de la microplaque 96 puits à analyser

L'analyse se fait par le logiciel « control » du spectrostar nano. Le résultat est en absorbance.

La courbe de calibration est tracée avec la gamme d'étalonnage (concentration en fonction de l'absorbance) (Figure 10). La régression linéaire avec forçage par 0 permet de calculer la concentration des échantillons par la formule suivante :

Concentration de l'échantillon = Absorbance x pente de la courbe d'étalonnage x facteur de dilution

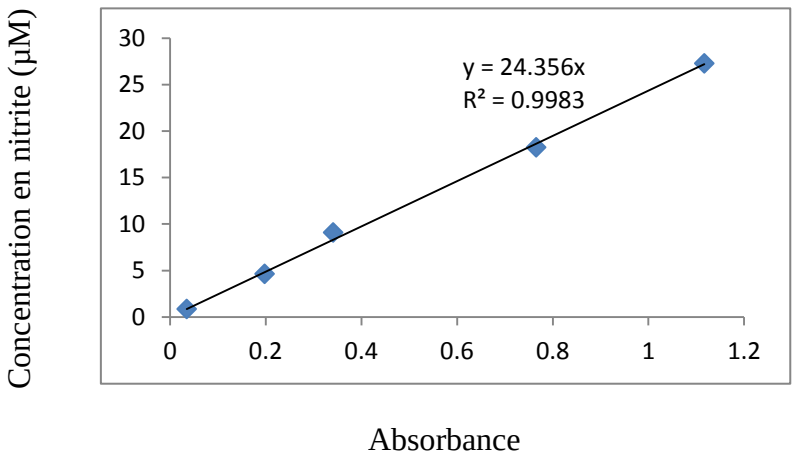

Figure 10 : Courbe de calibration de la gamme d'étalonnage

III.4 Traitement des données brutes

Les concentrations déterminées à 3 temps différents (0h (t0), 4h (t4), 22h (t22)) permettent de calculer les cinétiques de nitrosation et nitratation. Pour cela, les concentrations moyennes des triplicats ont été tracées en fonction du temps. La pente des droites obtenues par régression linéaire correspond à la vitesse de consommation ou de production de nitrite. Ces vitesses vont permettre de calculer les activités nitrosantes et nitratantes grâce aux formules suivantes (Cébron, 2004) :

Activité nitrosante = |vitesse témoin – vitesse inhibition avec l'allylthiourée|

Activité nitratante = |vitesse inhibition avec le sodium chlorate – vitesse témoin|

La vitesse témoin est établie grâce à l'échantillon A pour un dopage en de nitrite de 1000µM. Elle est ensuite recalculée pour les différents échantillons B à G en supposant que la vitesse témoin est proportionnelle au dopage.

Les activités nitrosante et nitratante peuvent être tracées en fonction de la concentration initiale de substrat. Pour tracer ces courbes, chaque point représente la moyenne des triplicats. Ces courbes sont les courbes de Michaelis-Menten. Elles permettent de déterminer Km et vmax. La vitesse vmax est déterminée par le plateau que l'on observe sur la courbe. C'est la vitesse maximale d'oxydation atteinte. Le Km se trouve en lisant l'abscisse du point de l'ordonnée vmax/2 (Figure 2).

Deux méthodes ont été utilisées pour déterminer ces constances. La première méthode a consisté à tracer une régression logarithmique. L'équation de la courbe va permettre de déterminer vmax (x= 2000 => plateau atteint) et Km (y = vmax/2). Une deuxième méthode consistait à utiliser le solveur Excel après avoir déterminer Km et vmax avec la première méthode pour affiner les résultats trouvés. Avec les valeurs de Km et vmax calculées par régression logarithmique, les vitesses théoriques en fonction du temps sont calculées par la formule suivante :

$$v = \frac{vmax \times [S]}{Km + [S]}$$

(Équation 1)

La somme des différences (vitesse observée – vitesse théorique) au carré correspond à « l'objectif à définir » du solveur. C'est la précision à laquelle il doit chercher les nouvelles constantes. Km et µmax sont rentrés comme « cellules variables ». Le solveur calcule alors de nouveau les Km et µmax en utilisant une régression non linéaire. On peut alors choisir de conserver les nouvelles valeurs ou de garder les précédentes valeurs trouvées par régression logarithmique.

La méthode utilisée sera la régression logarithmique car le solveur donne des résultats très proches de celle-ci et n'arrive pas à trouver des valeurs de Km et µmax pour tous les cas.

Les vmax en fonction de la température entre 0 et 25°C suivent l'équation théorique :

$$vmax\ (T) = vmax\ (20°C) \times \Theta^{T-20}$$ (Équation 2)

L'étude ici permettra alors de déterminer la constante théorique Θ (facteur de correction).

En utilisant une régression exponentielle, l'équation de la courbe observée s'écrit sous la forme :

$$y = a \times e^{bx}$$ (Équation 3)

Grâce à cette équation on peut calculer le vmax à deux températures différentes (T et 20°C). En remplaçant les vmax dans l'équation 2, on peut déterminer Θ :

$$\theta = \left(\frac{vmax\ (T°C)}{vmax\ (20°C)}\right)^{\frac{1}{(T-20)}}$$

(Équation 4)

Avec $vmax\ (T°C) = a\ e^{bxT}$ et $vmax\ (20°C) = a \times e^{bx20}$

On prendra ici T = 21°C pour simplifier la formule :

$$\theta = \frac{vmax\ (21°C)}{vmax\ (20°C)}$$

(Équation 5)

IV INTERPRETATION DES RESULTATS

IV.1 Stratégie de l'analyse des résultats

Les résultats bruts présentent des concentrations en nitrites à trois temps différents pour trois sites de prélèvement et 5 températures différentes.

Ces résultats permettent d'aborder trois axes de recherche de l'étude (Figure 11).

Dans un premier axe, le traitement des données permettra une étude des cinétiques de nitrosation et nitratation. Des taux maximum pour chaque site et température pourront être calculés. Pour cela, les concentrations sont tracées en fonction du temps. La pente permet d'obtenir le dS/dt (taux de production ou de consommation des nitrites). La courbe dS/dt en fonction du temps permet de déterminer le taux maximal (ordonnée du plateau de saturation).

Le deuxième axe repose sur la détermination des constantes de Michaelis-Menten.

Le troisième axe porte sur l'influence de la température sur les taux maximum déterminés dans l'axe 1. Pour cela, une courbe « taux maximal en fonction de la température sera tracée. La courbe obtenue devrait théoriquement être de la forme suivante pour des températures comprises entre 0 et 25°C :

$$vmax\ (T) = vmax\ (20°C) * \Theta^{(T-20)} \quad \text{(Équation 2)}$$

Les résultats observés permettront donc de déterminer un Θ qui d'après la littérature est compris entre 1,02 à 1,103 (Oleszkiewicz et Berquist, 1988, Lessouef et al., 1992; Queinnec et al., 2006).

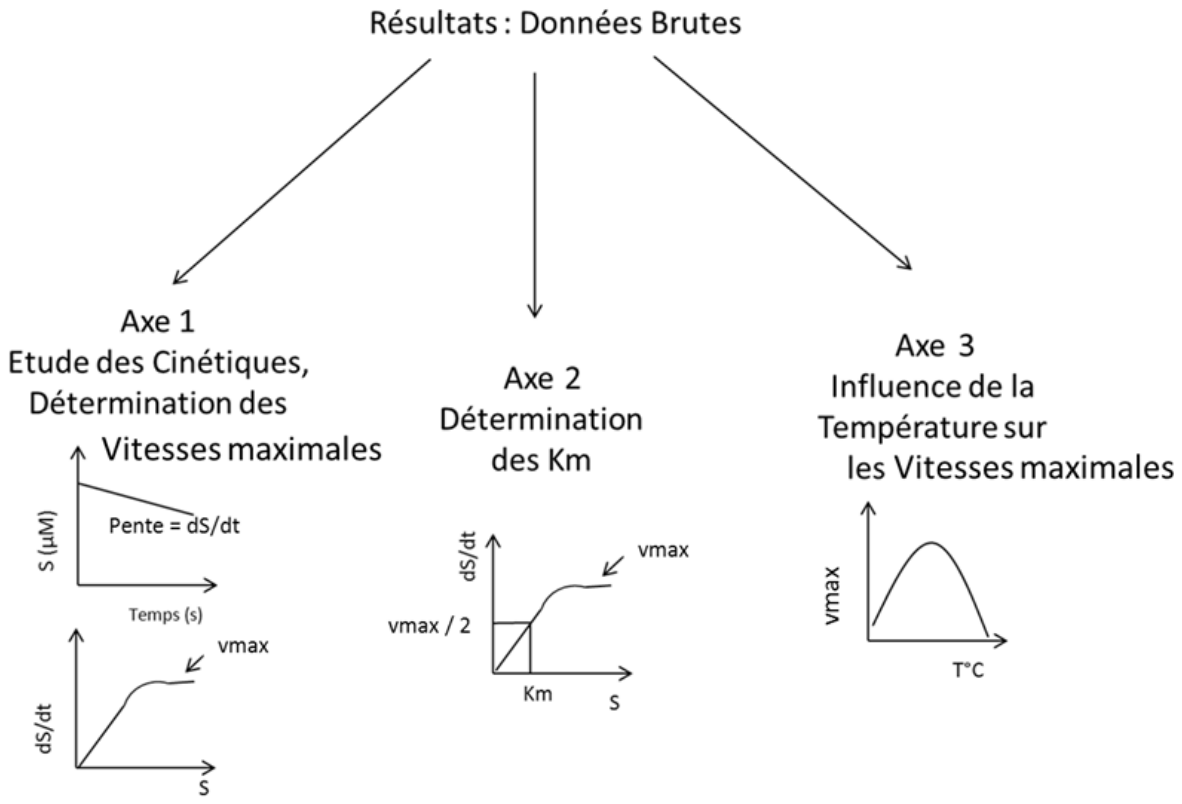

Figure 11 : Schéma récapitulatif des 3 axes d'interprétation des résultats

IV.2 Axe 1 : Etude des cinétiques à 20°C, détermination des taux maximum de nitrosation et nitratation

IV.2.1 Rejets SAV

La concentration en nitrites de l'échantillon témoin diminue au cours du temps (Figure 12). Dans l'idéal, celle-ci est censée être stable car les deux étapes de la nitrification sont inhibées. Cette diminution peut être due à des échanges avec l'atmosphère et/ou à la fixation des nitrites aux parois de l'erlenmeyer.

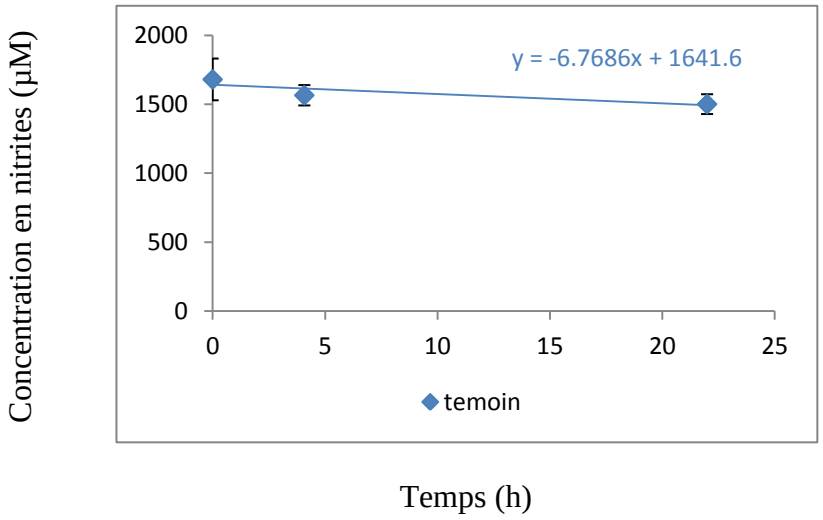

Figure 12 : Concentration en fonction du temps de l'échantillon témoin (A)

La vitesse témoin est, pour une concentration à 1600µM et une température de 20°C, de 6,7686 µM/h. Si nous ramenons cette vitesse aux concentrations des échantillons B à G, nous obtenons les vitesses suivantes :

Tableau 2 : Vitesses témoins pour les différents dopages (SAV)

Concentration initiale (µM)	Vitesse témoin correspondante ($\mu M.h^{-1}$)
384,51	-1,55
920,11	-3,70
1680,80	-6,77

Les échantillons B, C et D sont les échantillons où le nitrite est consommé (nitrosation bloquée). On observe bien cette consommation : les pentes des droites (concentrations en nitrites en fonction du temps) sont négatives (Figure 13). Ces pentes correspondent aux vitesses avec l'inhibition de l'allylthiourée.

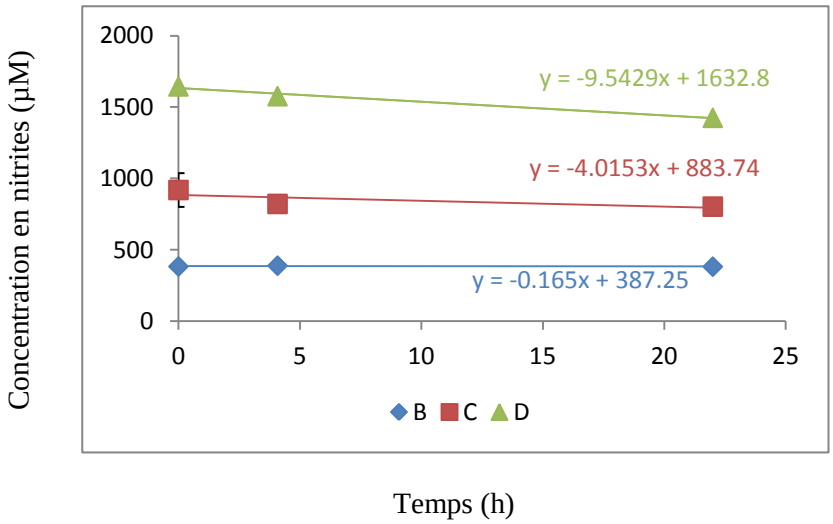

Figure 13 : Concentration en fonction du temps des échantillons dopés en nitrite (SAV)

Les échantillons E, F et G sont les échantillons où le nitrite est accumulé (nitratation bloquée). On observe bien cette production : les pentes des droites (concentrations en nitrite en fonction du temps) sont positives (Figure 14). Ces pentes correspondent aux vitesses avec l'inhibition par le sodium chlorate.

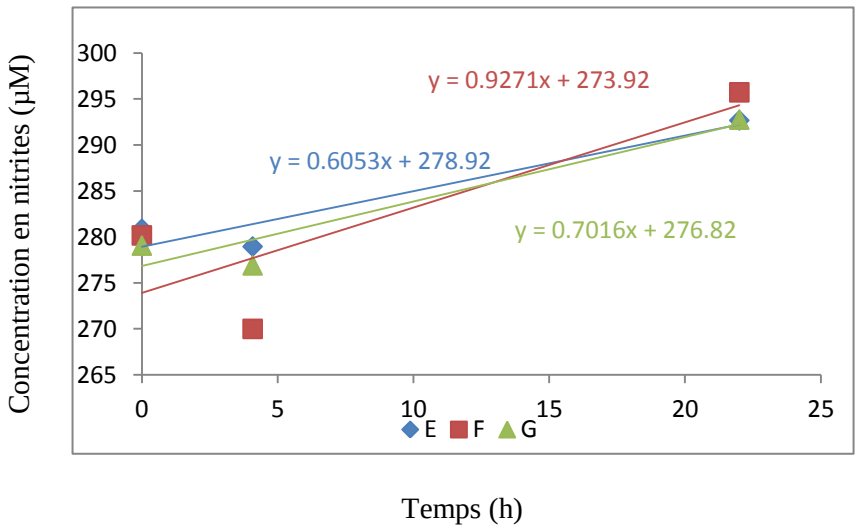

Figure 14 : Concentration en fonction du temps des échantillons dopés en ammonium (SAV)

Le Tableau 3 récapitule les valeurs de vitesses observées pour les echantillon B à G.

Tableau 3 : Activités nitrosantes et nitratantes sans prendre en compte les témoins (SAV)

Dopage (µM)	Activité nitrosante ($\mu M.h^{-1}$)	Activité nitratante ($\mu M.h^{-1}$)
100	-0,165	0,6053
500	-4,0153	0,9271
1000	-9,5429	0,7016

Les formules vues précédement pour calculer les activités nitrosante et nitratante ont été utilisées. Les valeurs du Tableau 4 ont ainsi été obtenues en soustrayant le Tableau 2 du Tableau 3.

Tableau 4 : Activités nitrosantes et nitratantes pour les différents échantillons (SAV)

Dopage (µM)	Activité nitrosante ($\mu M.h^{-1}$)	Activité nitratante ($\mu M.h^{-1}$)
100	-1,38	2,15
500	-0,31	4,63
1000	-2,77	7,47

Les courbes de Michaelis-Menten ont été tracées en prenant en abscisse la concentration initiale en nitrite ou le dopage en ammonium (la concentration initiale en ammonium n'étant pas connue) et en ordonnée, la valeur absolue de l'activitée nitrosante ou nitratante ce qui permettra d'avoir les deux courbes sur un même graphique avec une échelle positive.

Une regression logarithmique a été tracée pour les courbes de Michaelis-Menten. Cependant le coefficient de corrélation pour la nitrosation est très faible (Figure 15). Les vitesses maximales de nitrosation est de nitratation sont déterminée par les formules suivantes :

vmax nitrosation = 0,7878 x ln(2000) – 3,8161 = 2,17 $\mu M.h^{-1}$

vmax nitratation = 2,1735 x ln(2000) – 8,0915 = 8,43 $\mu M.h^{-1}$

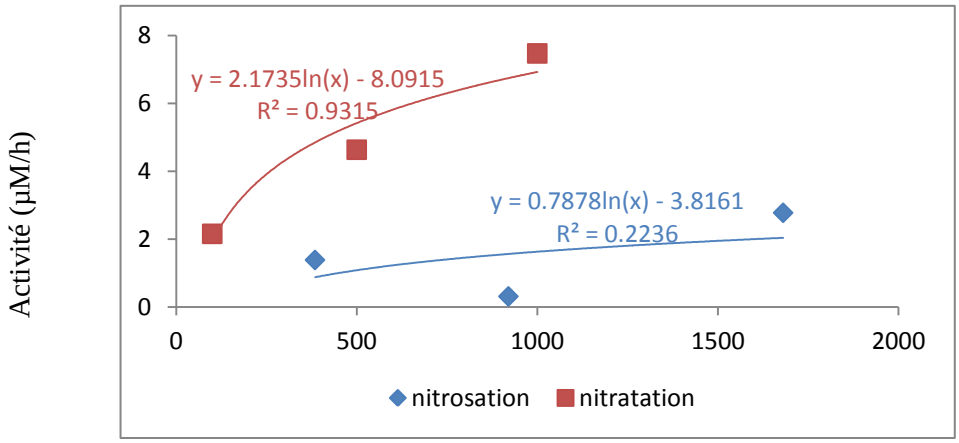

Figure 15 : Activité en fonction de la concentration à SAV

IV.2.2 Eau de Seine Poissy

Le Témoin ici est relativement stable dans le temps à avec une pente positive très faible (Figure 16).

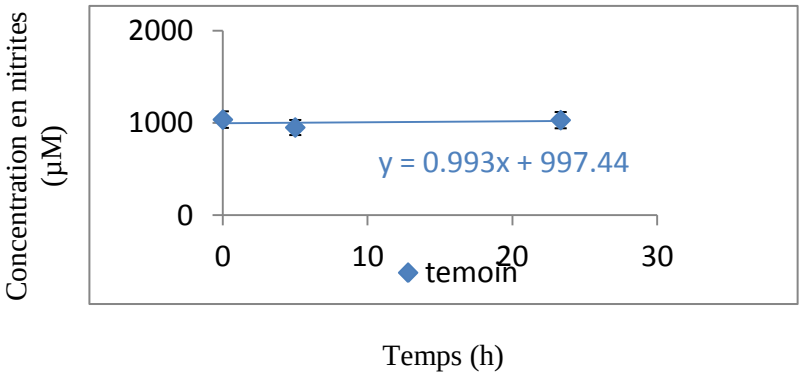

Figure 16 : Concentration en fonction du temps de l'échantillon témoin (Poissy)

Le Tableau 5 donne les vitesses témoins des trois dopages faits.

Tableau 5 : Vitesses témoins pour les différents dopages (Poissy)

Concentration initiale (µM)	Vitesse témoin correspondante ($\mu M.h^{-1}$)
162,45	0,13
601,99	0,48
1247,18	0,99

Les échantillons B, C et D sont les échantillons où le nitrite est consommé (nitrosation bloquée). On observe bien cette consommation : les pentes des droites (concentrations en nitrite en fonction du temps) sont négatives (Figure 17).

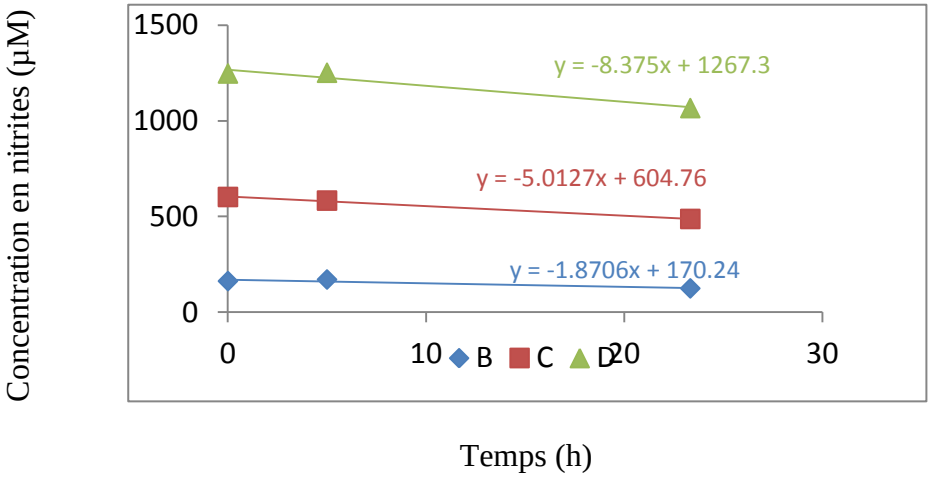

Figure 17 : Concentration en fonction du temps des échantillons dopés en nitrites (Poissy)

Les concentrations en E, F et G sont normalement censées augmenter dans le temps (nitratation bloquée). Cependant, on observe une diminution de la concentration assez forte sur le dernier point. Tous les triplicats des échantillons diminuent à T22 (Figure 18). Il ne peut donc pas s'agir d'une erreur ponctuelle lors des dilutions. Il peut y avoir eu une erreur lors de la lecture de plaques par le spectromètre pour le point T22.

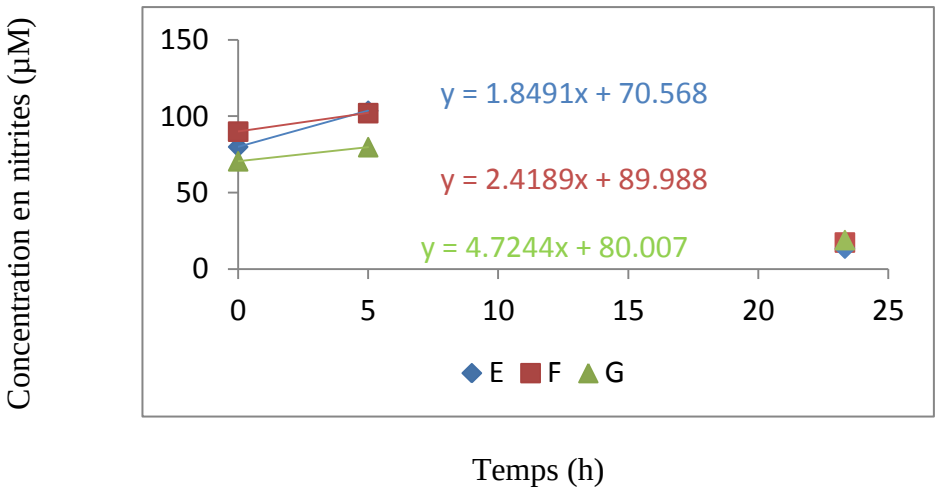

Figure 18 : Concentration en fonction du temps des échantillons dopés en ammonium (Poissy)

Le Tableau 6 récapitule les valeurs de vitesses observées pour les échantillons B à G

Tableau 6 : Activités nitrosantes et nitratantes sans prendre en compte les témoins (Poissy)

Dopage (µM)	activité nitrosante ($\mu M.h^{-1}$)	activité nitratante ($\mu M.h^{-1}$)
100	-1,8706	1,8491
500	-5,0127	2,4189
1000	-8,375	4,7244

Les activités nitrosante et nitratante sont calculées comme pour SAV (Tableau 7).

Tableau 7 : Activités nitrosantes et nitratantes pour les différents échantillons (Poissy)

Dopage (µM)	activité nitrosante ($\mu M.h^{-1}$)	activité nitratante ($\mu M.h^{-1}$)
100	-1,97	1,72
500	-5,51	1,94
1000	-9,37	3,73

Les courbes de Michaelis-Menten pour la nitrosation et la nitratation ont un coefficient de corrélation correcte (Figure 19). Les vmax ont été déterminés avec la même méthode que SAV :

vmax nitrosation = 3,502 x ln(2000) - 16,115 = 10,50 $\mu M.h^{-1}$

vmax nitratation = 0,7668 x ln(2000) - 2,0837 = 3,74 $\mu M.h^{-1}$

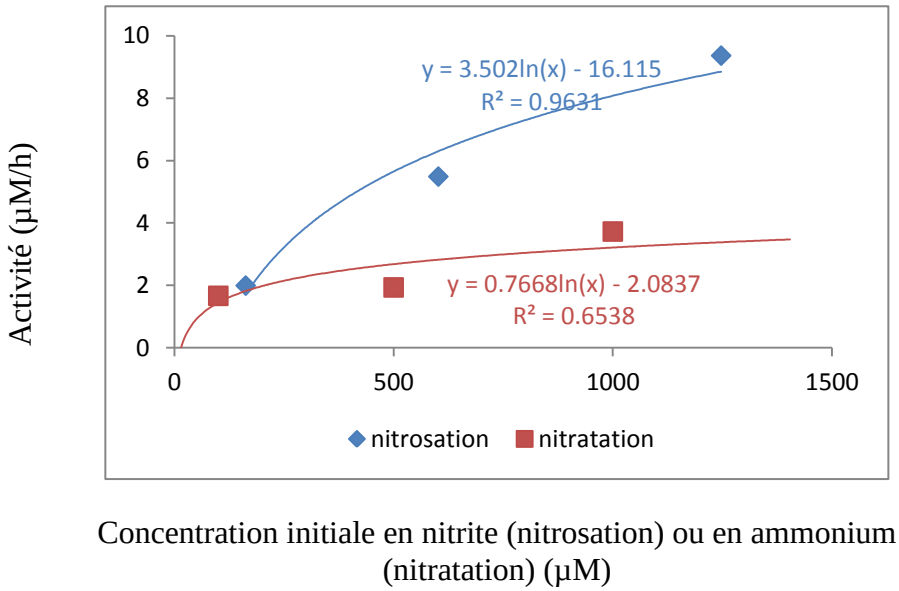

Figure 19 : Activité en fonction de la concentration à Poissy

IV.2.3 Eau de Seine Asnières

Le témoin a une pente négative. Il y a donc des interactions autres que bactériennes qui se produisent (Figure 20).

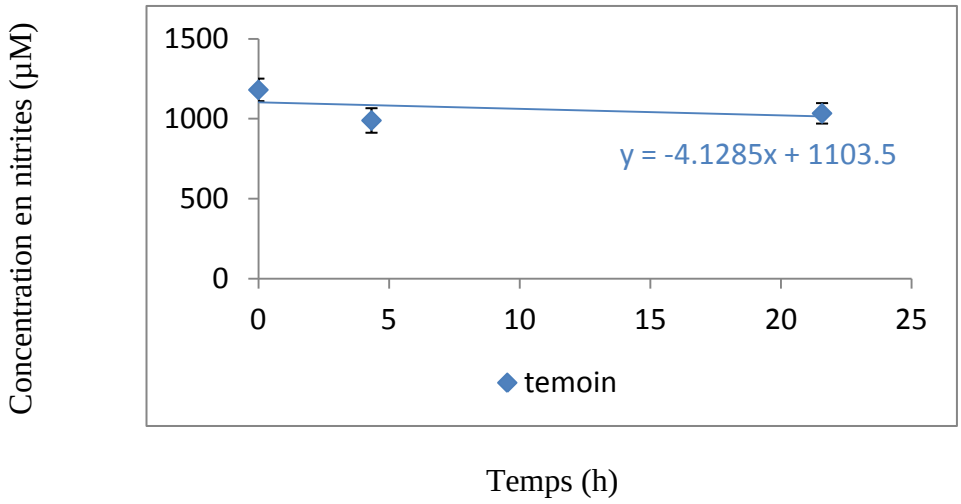

Figure 20 : Concentration en fonction du temps de l'échantillon témoin (Asnières)

Le Tableau 8 donne les vitesses témoins des trois dopages faits.

Tableau 8 : Vitesses témoins pour les différents dopages (Asnières)

Concentration initiale (µM)	Vitesse témoin correspondante ($\mu M.h^{-1}$)
106,06	-0,39
543,60	-2,02
1112,33	-4,13

Les concentrations des échantillons bloqués pour la nitrosation, diminuent. Les nitrites sont bien consommés et oxydés pour donner des nitrates (Figure 21).

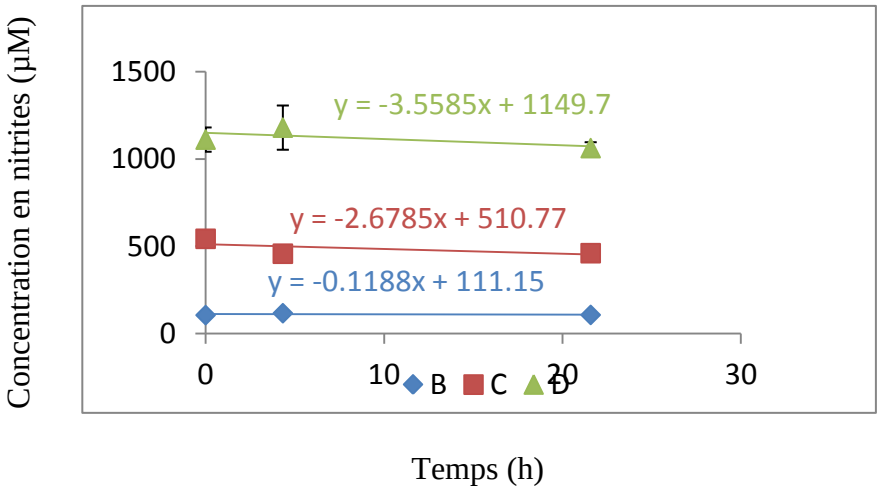

Figure 21 : Concentration en fonction du temps des échantillons dopés en nitrite (Asnières)

Les échantillons bloqués pour la nitratation accumulent bien les nitrites (pente positive) mais à de très faibles vitesse (valeur faible de la pente) (Figure 22).

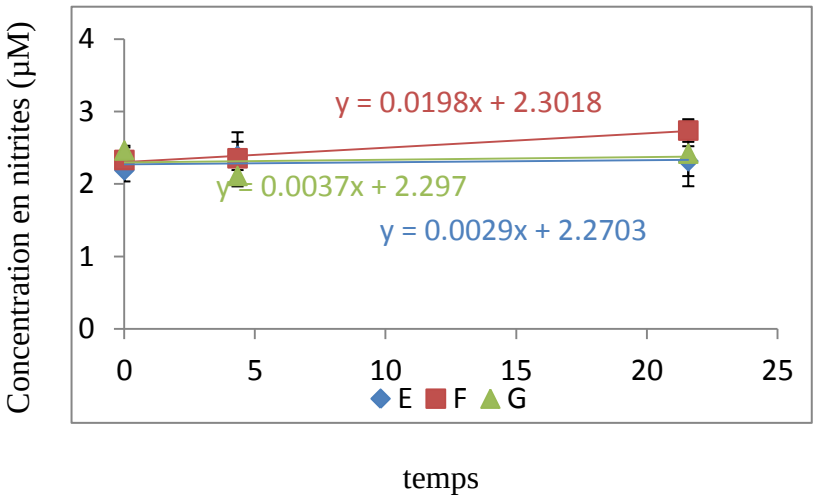

Figure 22 : Concentration en fonction du temps des échantillons dopés en ammonium (Asnières)

Le Tableau 9 récapitule les valeurs de vitesses observées pour les echantillon B à G.

Tableau 9 : Activités nitrosantes et nitratantes sans prendre en compte les témoins (Asnières)

Dopage (µM)	Activité nitrosante ($\mu M.h^{-1}$)	Activité nitratante ($\mu M.h^{-1}$)
100	-0,1188	0,0029
500	-2,6785	0,0198
1000	-3,5585	0,0037

Les activités nitrosante et nitratante sont calculées comme pour SAV et Poissy (Tableau 10).

Tableau 10 : Activités nitrosantes et nitratantes pour les différents échantillons (Asnières)

Dopage (µM)	Activité nitrosante ($\mu M.h^{-1}$)	Activité nitratante ($\mu M.h^{-1}$)
100	-0,29	0,42
500	-0,61	2,08
1000	-0,57	4,13

Les courbes de Michaelis-Menten permettent de déterminer les vmax comme précédemment. (Figure 23) :

$$vmax\ nitrosation = 0{,}73\ \mu M.h^{-1}$$

$$vmax\ nitratation = 5{,}10\ \mu M.h^{-1}$$

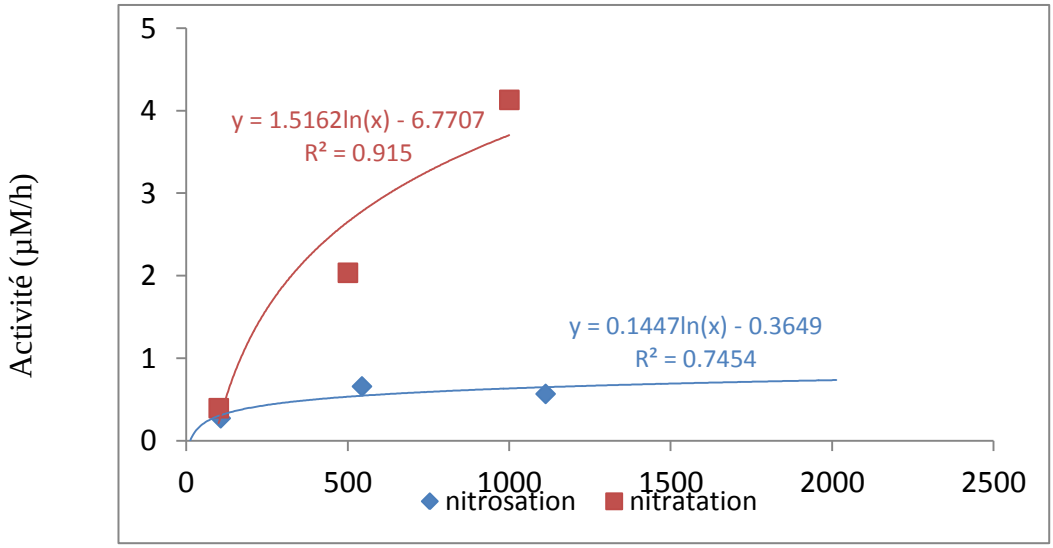

Figure 23 : Activité en fonction de la concentration à Asnières

IV.2.4 Bilan des résultats pour les trois sites et variations spatiale de vmax

Les échantillons permettant d'évaluer la consommation de nitrites montrent des résultats cohérents. La concentration diminue au cours du temps et cette diminution est plus prononcée avec l'augmentation du dopage. Les échantillons permettant d'évaluer la production de nitrites présentent des résultats moins attendus. Les concentrations n'augmentent pas forcément suivant les échantillons. L'augmentation en nitrites ne suit pas la concentration du dopage. Il y a donc un problème au niveau de la mesure pour les échantillons dopés en ammonium. En effet, ceux-ci sont moins concentrés en nitrites. La variation alors observée au cours du temps n'est peut-être pas assez forte : l'erreur de la mesure est supérieure à la production de nitrite.

L'expérience à 20°C a été faite deux fois et a permis de recalculer des vmax de nitrosation et de nitratation avec une semaine d'écart entre les deux expériences. Les valeurs trouvées sont très différentes. La répétabilité n'est pas observée. Cela peut être dû à un mode opératoire qui manque de précision au niveau de la mesure ou alors à l'eau de Seine qui a une cinétique fortement différente d'une semaine à une autre (peu probable) (Tableau 11).

Tableau 11 : Tableau récapitulatif des vitesses maximales à 20°C

	température	20°C a	20°C b	moyenne	écart-type
Asnières	nitrosation	0,73	5,45	3,09	3,33
	nitratation	5,10	2,36	3,73	1,94
Poissy	nitrosation	10,50	0,72	5,61	6,92
	nitratation	3,72	0,48	2,10	3,14
SAV	nitrosation	2,17	18,26	10,22	11,38
	nitratation	8,43	4,02	6,22	3,12

La vitesse de nitrosation est plus faible à Asnières qu'à Poissy et Sav. Les vitesses de nitrosation sont plus importantes que les vitesses de nitratation à Poissy et à SAV. A Asnières la vitesse de nitratation est légèrement plus élevée que la vitesse de nitrosation. Le profil observé à Poissy semble donc être influencé par les rejets de SAV (Figure 24). Ces observations sont tout de même à prendre avec précautions car les écart-types sont très importants.

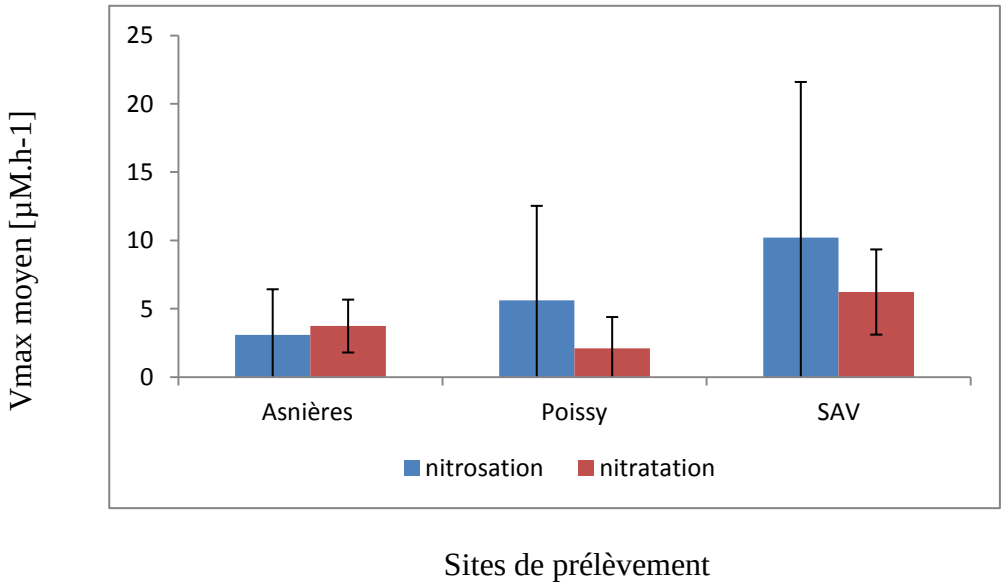

Figure 24 : Variation spatiale de la vitesse maximale de nitrosation et de nitratation le long de la Seine à 20°C

IV.3 Axe 2 : Détermination des constantes de Michaelis-Menten

IV.3.1 Résultats à SAV

Les courbes de Michaelis-Menten permettent par régression logarithmique de déterminer les Km. On résout ainsi le calcul en prenant l'équation de la régression et en remplaçant y par vmax / 2. On a donc :

Km nitrosation = exp((vmax/2+3,8161)/0,7878) = 504 µM

Km nitratation = exp((vmax/2+8,0915)/2,1735) = 288 µM

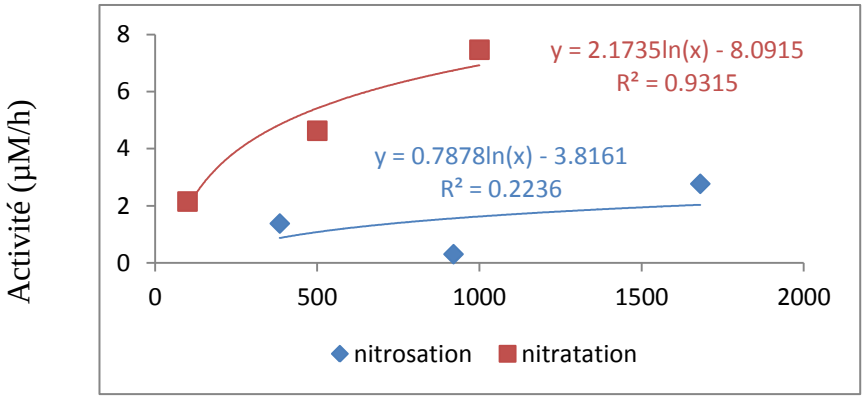

Figure 25 : Activité en fonction de la concentration à SAV

IV.3.2 Résultats à Poissy

Par le même calcul qu'à SAV, on a :

Km= exp((vmax/2+16,115)/3,502) = 446 µM

Km= exp((vmax/2+ 1,9318)/0,7438) = 164 µM (Figure 26)

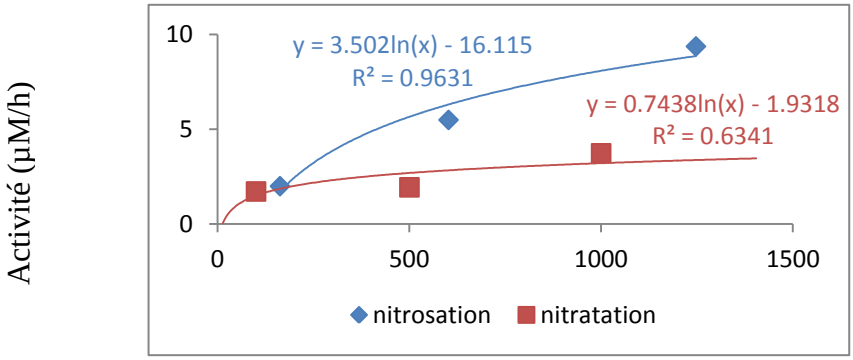

Figure 26 : Activité en fonction de la concentration à Poissy

IV.3.3 Résultats à Asnières

Les courbes de Michaelis-Menten permettent comme à Poissy et SAV de déterminer les Km (Figure 27) avec les formules suivantes :

$$\text{Km nitrosation} = \exp((vmax/2+0{,}3649)/0{,}1447) = 158\ \mu M$$

$$\text{Km nitratation} = \exp((vmax/2+6{,}7707)/1{,}5162) = 391 \mu M$$

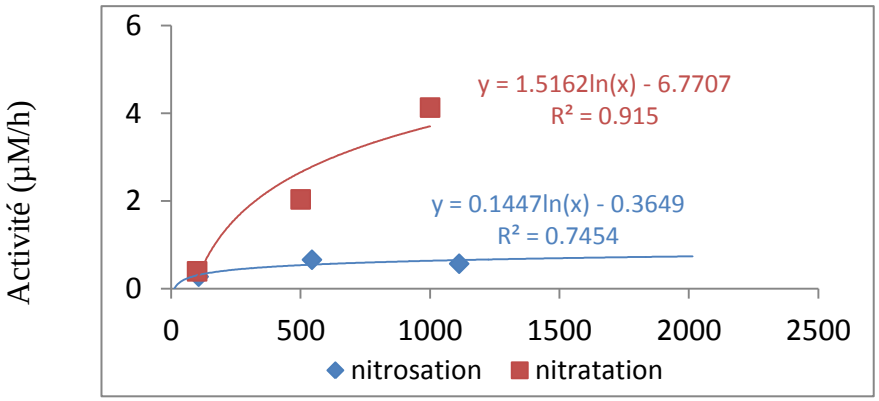

Figure 27 : Activité en fonction de la concentration à Asnières

IV.3.4 Bilan des différents Km déterminés à différentes températures

Les constantes Km ont été déterminées par régression logarithmique pour les différentes températures (Tableau 12). Les constantes Km varient en fonction de la température.

Tableau 12 : Tableau bilan des paramètres Km déterminés pour les différentes températures

Asnières	température	5°C	10°C	15°C	20°C a	20°C b	30°C	
	Km	523	465	335	158	505	282	nitrosation
	Km	444	220	421	391	446	456	nitratation
Poissy	température	5°C	10°C	15°C	20°C a	20°C b	30°C	
	Km	517	307	490	446	89	497	nitrosation
	Km	523	295	234	164	147	488	nitratation
SAV	température	5°C	10°C	15°C	20°C a	20°C b	30°C	
	Km	556	602	659	504	816	734	nitrosation
	Km	784	469	321	288	508	718	nitratation

Les constantes Km pour la nitrosation sont très différentes selon les sites et la température. A 20°C, la valeur des Km est très différente entre les deux expériences. Le Km semble relativement peu influencé par la température. Il n'y a pas de tendance particulière qui se dégage (Figure 28).

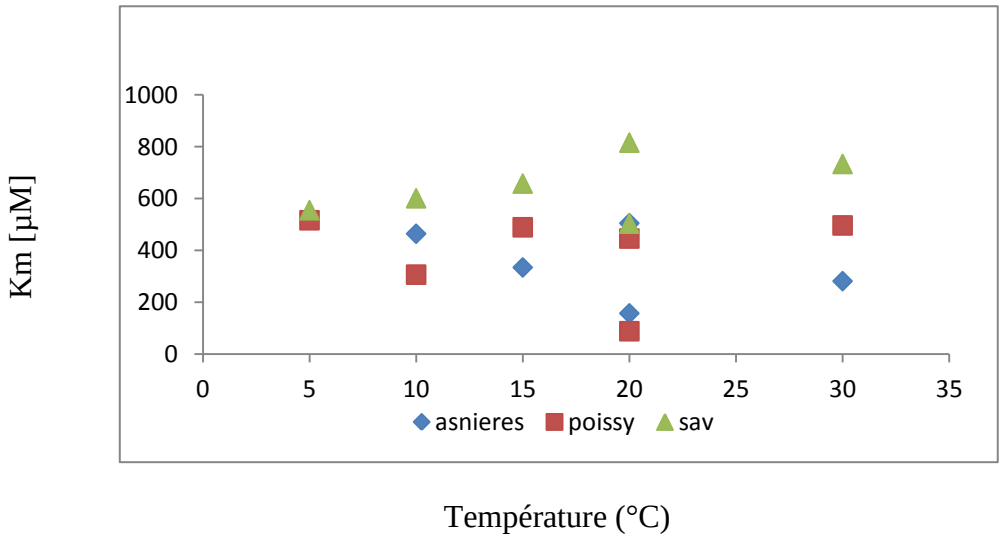

Figure 28 : Variation de la constante de Michaelis de nitrosation le long de la Seine en fonction de la température

Les constantes de Michaelis-Menten pour la nitratation sont légèrement différentes selon les sites. En effet, on observe la même tendance pour les trois sites : le Km diminue avec l'augmentation de la température puis ré-augmente. Cependant, le km le plus faible est aux alentours de 20°C pour Poissy et SAV alors qu'il est aux alentours de 10°C pour Asnières. Une faible valeur de Km signifie une plus grande affinité avec le substrat. Ainsi les températures les plus propices au processus de nitrification seraient 20°C pour Poissy et SAV et 10°C pour Asnières (Figure 29).

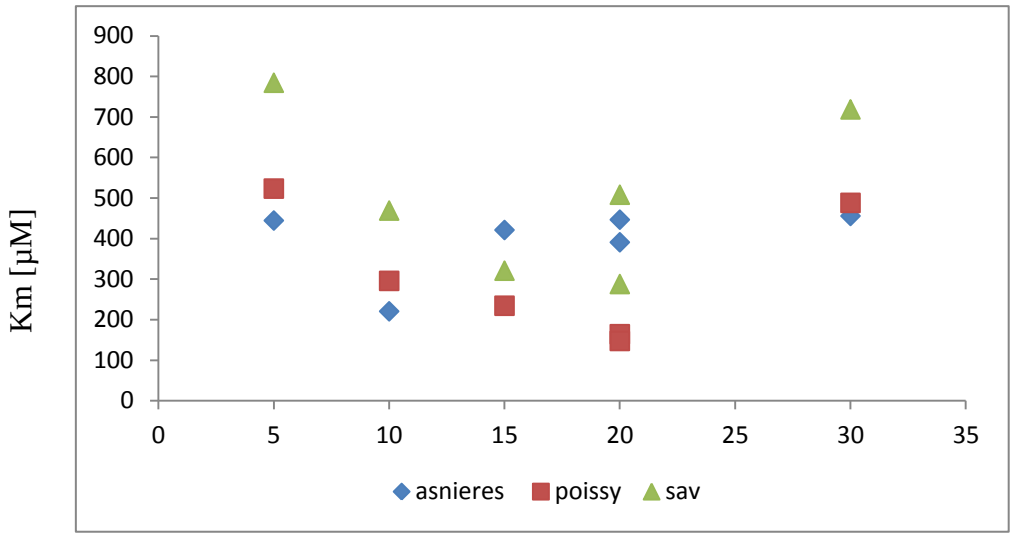

Figure 29 : Variation de la constante de Michaelis de nitratation le long de la Seine en fonction de la température

IV.4 Axe 3 : Influence de la Température sur les taux maximaux

IV.4.1 Profils des Vitesses maximales en fonction de la température

Les constantes vmax ont été déterminées par régression logarithmique pour les différentes températures (Tableau 13).

Tableau 13 : Tableau bilan des paramètres vmax déterminés pour les différentes températures

Asnières	température	5°C	10°C	15°C	20°C a	20°C b	30°C	
	vmax	2,47	2,30	2,25	0,73	5,45	1,62	nitrosation
	vmax	11,41	10,35	12,35	5,10	2,36	12,01	nitratation
Poissy	température	5°C	10°C	15°C	20°C a	20°C b	30°C	
	vmax	5,89	0,73	5,58	10,50	0,72	8,30	nitrosation
	vmax	15,19	0,14	1,62	3,72	0,48	5,17	nitratation
SAV	température	5°C	10°C	15°C	20°C a	20°C b	30°C	
	vmax	14,83	22,14	8,77	2,17	18,26	6,53	nitrosation
	vmax	26,85	9,80	13,69	8,43	4,02	14,80	nitratation

Les vitesse vmax varient de 0,73 à 22,06 µM.h-1. Les vitesses pour le site d'Asnières varient peu entre 0,73 et 4,13 µM.h-1 (Figure 30). Les valeurs de vmax pour la nitrosation sont globalement plus élevées par rapport à la littérture (0,72-22,14 pour 0,06-0,14) (Raimonet et al., 2014).

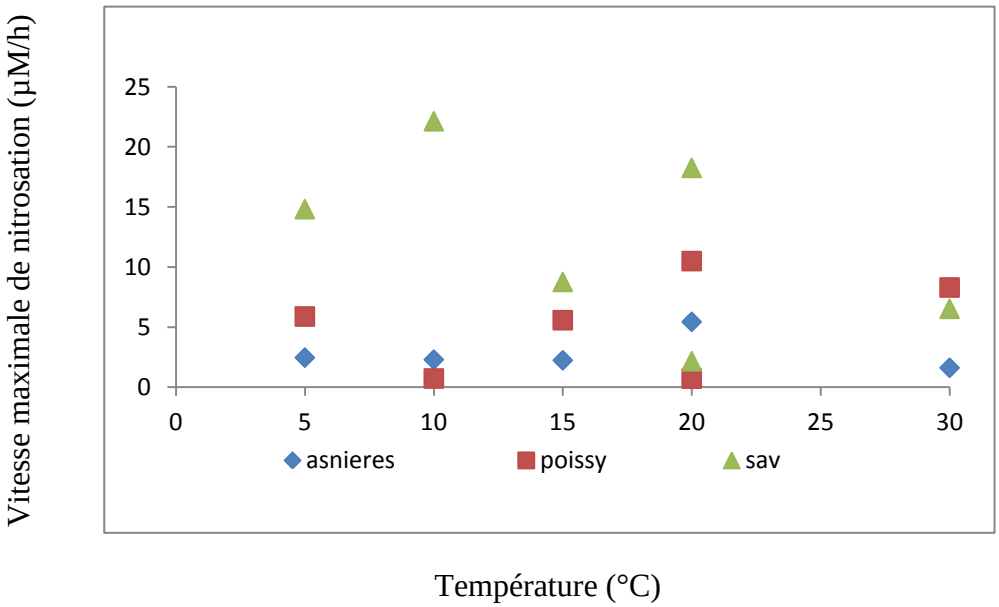

Figure 30 : Influence de la température sur les vitesses maximales d'oxydation pour la nitrosation pour les différents sites

La vitesse vmax augmente de 0,14 à 4,92 µM.h-1 avec la température sur le site de Poissy de 10 à 20°C. Ces valeurs sont très semblables aux valeurs trouvées par Raimonet et al., 2014 (1 à 4,7-5 µM.h-1). Les valeurs à Asnières sont plus élevées que dans la littérature (3,80 ± 1,08 µM.h-1, Raimonet et al., 2014) (Figure 31).

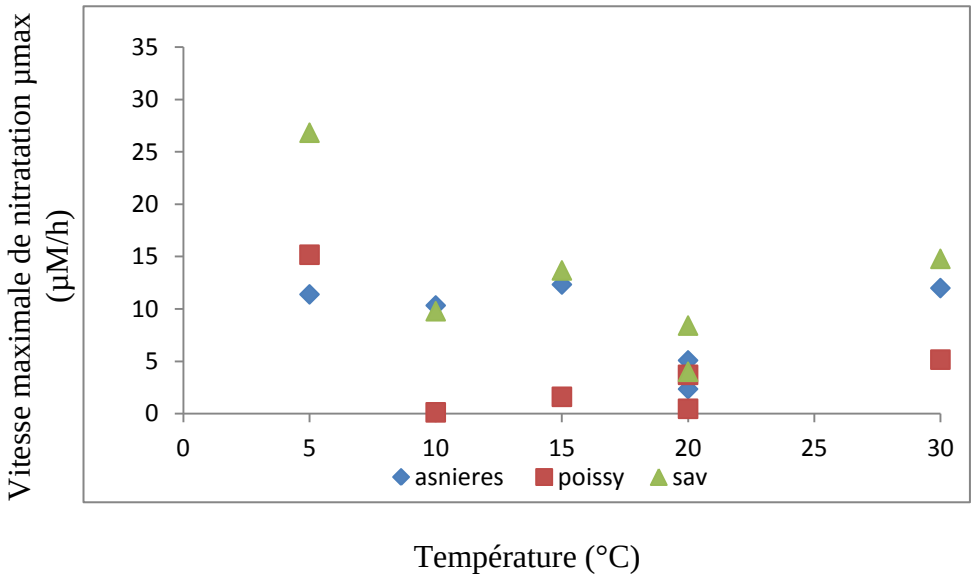

Figure 31 : Influence de la température sur les vitesses maximales d'oxydation pour la nitratation pour les différents sites

IV.4.2 Détermination du facteur de correction Θ

Les vmax en fonction de la température entre 0 et 25°C doivent normalement suivre l'équation théorique :

$$vmax\ (T) = vmax\ (20°C) \times \Theta^{T-20} \quad \text{(Équation 2)}$$

Cependant, ce n'est pas tout à fait le cas ici. Le calcul de Θ est impossible en prenant en compte toutes les données. Si on ne prend pas en compte le point à 5°C qui est plus élevé que ce qui est attendu théoriquement, les courbes peuvent suivre cette équation théorique pour la nitrosation à Poissy et Asnières (Figure 32). Le point à 10°C à SAV est très élevé et n'a pas été pris en compte pour la régression exponentielle.

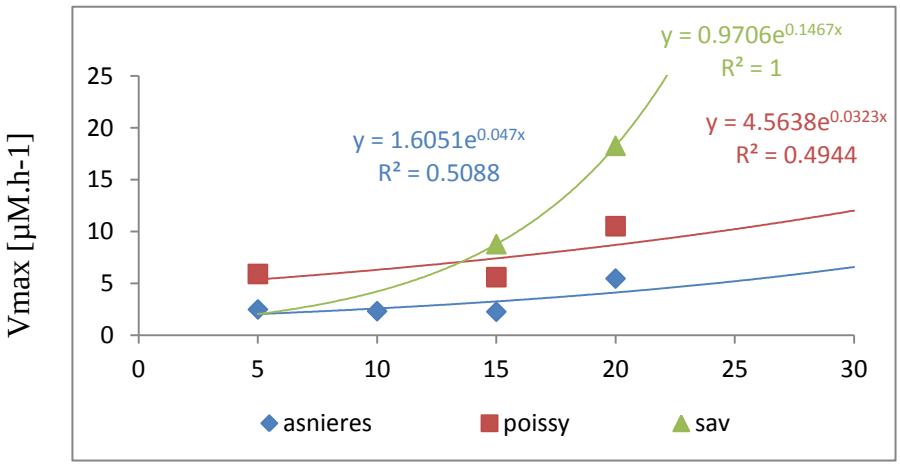

Figure 32 : Influence de la température sur les vitesses maximales d'oxydation pour la nitrosation pour les différents sites (10-15-20°C)

Les équations trouvées grâce aux régressions exponentielles permettent de calculer les vitesses maximales théoriques pour 20 et 21 °C. Par exemple à Asnières, l'équation est la suivante :

$$Vmax\ (T) = 1{,}6051 \times e^{0.047 \times T}$$

Avec T = 21°C et 20°C

On a donc :

$Vmax(21°C) = 1{,}6051 \times e^{0.047 \times 21}$

$Vmax(20°C) = 1{,}6051 \times e^{0.047 \times 20}$

D'après l'équation 2, on a :

$$\Theta = \left(\frac{vmax\ (T°C)}{vmax(20°C)}\right)^{\frac{1}{T-20}}$$

(Équation 4)

En utilisant les équations 10 et 11 dans l'équation 12, le facteur de correction Θ peut donc être calculer avec la formule suivante :

$$\Theta_{Asnières} = \frac{1{,}6051 \times e^{0{,}047 \times 21}}{1{,}6051 \times e^{0{,}047 \times 20}} = \frac{3{,}94}{3{,}72} = 1{,}06$$

Les facteurs de corrections à Poissy et à SAV sont déterminés de la même façon.

Pour la nitratation, les données à Poissy permettent de faire une régression exponentielle. Le point à 20°C pour Asnières et SAV est trop bas et est surement incorrect. Les points à 20°C n'ont donc pas été pris en compte (Figure 33). Le point à 5°C à Asnières n'est pas aberrant et a donc été gardé pour la régression exponentielle.

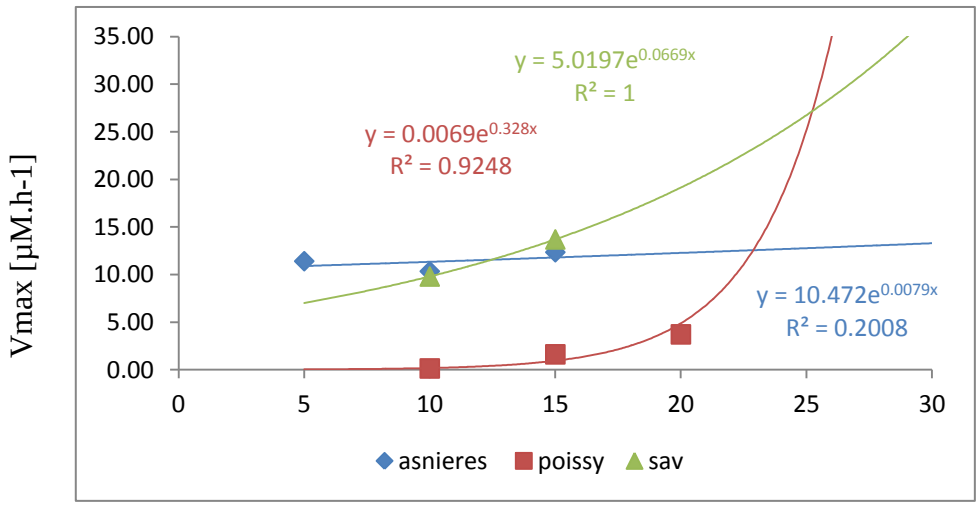

Figure 33 : Influence de la température sur les vitesses maximales d'oxydation pour la nitratation pour les différents sites (10-15-20°C)

Les facteurs de correction Θ pour la nitrosation et nitratation sur les trois sites différents ont été déterminés. Ces facteurs varient de 1,01 à 1,39. Les Θ de la nitrosation trouvés à Asnières et à Poissy et le Θ de la nitratation à SAV, sont cohérents et dans la gamme recensée dans la littérature (1,02-1 ,103) (Oleszkiewicz et Berquist, 1988, Lessouef et al., 1992; Queinnec et al., 2006). Les autres valeurs ne sont pas aberrantes mais légèrement plus élevées de 0,057 pour la nitrosation à SAV, de 0,287 pour la nitratation à Poissy et légèrement plus faible de 0,01 pour la nitratation à Asnières (Tableau 14).

Tableau 14 : Facteurs de correction Θ pour la nitrosation et la nitratation sur les trois sites

Nitrosation	**vmax (21°C)**	**vmax (20°C)**	**Θ**
SAV	21,13	18,25	1,16
Asnières	4,31	4,11	1,05
Poissy	8,99	8,71	1,03
Nitratation	**vmax (21°C)**	**vmax (20°C)**	**Θ**
SAV	20,46	19,13	1,07
Poissy	6,77	4,87	1,39
Asnières	12,36	12,26	1,01

IV.5 Bilan général des résultats obtenus

Les différents résultats obtenus sont récapitulés dans le Tableau 15. Les données obtenues lors de l'expérience ne sont pas forcément très fiables. Il se peut qu'il y ait des imprécisions conséquentes au niveau des mesures en nitrite par colorimétrie alors que les cinétiques en seine pour le nitrite sont relativement lentes. Les valeurs obtenues pour les différents paramètres ne sont donc pas forcément très cohérentes par rapport à la théorie. Les résultats obtenus pour la nitrosation sont plus élevés que dans la littérature d'au moins un facteur 10 (par exemple, vmax à Asnières est de 0,73µM.h-1 pour 0,06µM.h-1 dans l'article de Raimonet et al., 2014). Les valeurs trouvées pour la nitratation à 20°C sont relativement proches à Asnières (Km de 391-446 µM pour un Km de 355 µM dans l'article) (Tableau 16).

La répétabilité de l'expérience n'est pas très fiable. Deux expériences à 20°C ont trouvé des constantes parfois très différentes (exemple : Asnières Km nitrosation a = 157 µM et Km nitrosation b = 506µM).

Tableau 15 : Tableau bilan des constantes déterminées

		Nitrosation						Nitratation					
	température	5°C	10°C	15°C	20°C a	20°C b	30°C	5°C	10°C	15°C	20°C a	20°C b	30°C
Axe 1 vmax	SAV	14,83	22,14	8,77	2,17	18,26	6,53	26,85	9,80	13,69	8,43	4,02	14,80
	Poissy	5,89	0,73	5,58	10,50	0,72	8,30	15,19	0,14	1,62	3,72	0,48	5,17
	Asnières	2,47	2,30	2,25	0,73	5,45	1,62	11,41	10,35	12,35	5,10	2,36	12,01
	température	5°C	10°C	15°C	20°C a	20°C b	30°C	5°C	10°C	15°C	20°C a	20°C b	30°C
Axe 2 Km	SAV	556	602	659	504	816	734	784	469	321	288	508	718
	Poissy	517	307	490	446	89	497	523	295	234	164	147	488
	Asnières	523	465	335	158	506	282	444	220	421	391	446	456
Axe 3 Θ	SAV	1,16						1,07					
	Poissy	1,05						1,39					
	Asnières	1,03						1,01					

Tableau 16 : Valeurs de constantes vmax et Km déterminées sur des eaux de Seine dans la littérature

		Communauté nitrosante		communauté nitratante	
		km	**vmax**	**km**	**vmax**
Raimonet et al., 2014	eau de Seine Asnières (20°C)	10-13 µM	0,06 $\mu M.h^{-1}$	355 µM	3,8 $\mu M.h^{-1}$
	eau de Seine Poissy (20°C)	10-13 µM	0,14 $\mu M.h^{-1}$	311 µM	5,03 $\mu M.h^{-1}$

CONCLUSION GENERALE

La nitrification est depuis la fin du 19ème siècle une réaction biogéochimique connue et étudiée. Cependant, les études cinétiques « in situ » pour la nitrosation et la nitratation sont récentes sur des eaux de rivières (années 2000) sauf rares exceptions et les températures étudiées était relativement restreintes (T° ambiante, 4°C et parfois 30°C). Cette étude a étudié ces cinétiques pour cinq températures différentes et pour trois sites différents.

Le mode opératoire mis au point permet de traiter une quantité importante d'échantillon en même temps (63 échantillons dans cette étude) avec une analyse rapide moins de 2 minutes pour analyser la plaque en colorimétrie. Cependant, cette analyse nécessite une dilution des échantillons pour rentrer dans la gamme étalon (1µM à 30µM). Or cette dilution peut être source d'imprécision sur la mesure finale. Il serait donc intéressant d'évaluer l'erreur engendrée de la dilution sur la mesure en réalisant par exemple, des triplicats pour les dilutions et en analysant trois fois l'échantillon sur trois microplaques différentes. Il serait alors possible d'évaluer l'erreur sur la dilution et sur la lecture de la microplaque.

Les résultats ne sont pas cohérents pour tous les échantillons. Les échantillons ont présenté des résultats qui semblent corrects et proches des résultats trouvés dans la littérature pour la nitratation en particulier à Poissy. Les résultats de la nitrosation étaient plus élevés que dans la littérature.

Cette étude a permis au SIAAP de se familiariser aux techniques de détermination des constantes cinétique. Elles permettent d'avoir une première approche très intéressante du devenir des nitrites, composé sensible actuellement en Seine. Ces constantes telles que Km, vmax et Θ alimentent très souvent des modèles de prédiction du devenir de l'azote. Ces modèles de prédiction sont très utiles au SIAAP pour améliorer la gestion des stations d'épuration qui permettent de limiter l'impact des rejets domestiques sur la Seine et de garantir le bon état du cours d'eau.

Cette étude a aussi permis d'apprécier la difficulté de ce type de manipulation. Des travaux sont encore à réaliser afin d'améliorer la robustesse et la répétabilité de l'expérience. Il serait par exemple possible de faire durer l'expérience un peu plus longtemps sur 48h ou 72h pour bien observer un plateau. Changer de méthode de mesure pour les nitrites pourrait être utile pour diminuer les dilutions nécessaires.

Ce stage s'est donc concentré sur l'étude des composés azotés en Seine : dans un premier temps, sur la mise en œuvre de sonde *in-situ* permettant le suivi de la concentration en nitrite, nitrate et ammonium à pas de temps fin et dans un deuxième temps, sur l'étude des cinétiques de la nitrification qui permettent de mieux connaître le devenir de l'azote en Seine.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Billen G., Garnier J., 2009, Eutrophisation des cours d'eau du bassin de la Seine, **Programme PIREN-Seine**, 6, 44 pages, ISBN : 978-2-918251-05-7

- Brion N., Billen G., 1998, Une réevaluation de la méthode d'incorporation de H14CO3- pour mesurer la nitrification autotrophe et son application pour estimer des biomasses de bactéries nitrifiantes, **Rev. Sci. Eau**, 11, 283-302

- Cazier T., Raimonet M., Rocher V., Viollier Eric, Roose-Amsaleg C., Garnier J., Laverman A., 2014, Impact de l'agglomération Parisienne sur la communauté nitrifiante et la dynamique du nitrite de la Seine, **Rapport PIREN-Seine** phase 6, 19 pages.

- Cébron A., 2004, Nitrification, Bactéries Nirifiantes et émission de N2O, Thèse de doctorat à l'université Pierre et Marie Curie spécialité Ecologie Microbienne-Sciences de l'eau

- Cébron A., Garnier J., 2005, *Nitrobacter* and *Nitrospira* genera as representatives of nitrite-oxidizing bacteria : Detection, quantification and growth along the lower Seine River (France), **Water Research**, 39, 4979-4992

- Ciudad G., Werner A., Bornhardt C., Munoz C., Antileo C., 2006, Differential kinetics of ammonia and nitrite-oxidizing bacteria : A simple kinetic study based on oxygen affinity and proton release during nitrification, **Process Biochemistry**, 41, 1764-1772

- Grouz N. A., Billen G., Garnier J., Mercier B., Martinez A., 2013, Nitrification et dynamique des formes de l'azote dans la Seine et son estuaire suite aux changements du traitement des eaux usées à Paris : comparaison entre les périodes 2001-2003 et 2011-2013, **rapport PIREN-Seine** phase 6, 19 pages

- Henze M., Harremoës P., La Cour Jansen J., Arvin E., Wastewater treatment : biological and chemical processes, 1997, **Springer**, ISBN 3-540-62702-2

- Jiménez E., Giménez J. B., Ruano M. V., Ferrer J., Serralta J., 2011, Effect of pH and nitrite concentration on nitrite oxidation rate, **Bioresource Technology**, 102,8741-8747

- Knowles G., Downing A. L., Barrett M.J., 1965, Determination of kinetic constants for nitrifying bacteria in mixed culture, with the aid of an electronic computer, **J. gen. Microbiol**, 38, 268-278

- Le Roch C., 2010, Problématique nitrites : de la station d'épuration au milieu naturel, **rapport master SAGE-SIAAP**, 102 pages

- Lesouef. A., Payraudeau M., Rogalla F. and Kleiber B., 1992, Optimizing nitrogen removal reactor configurations by on-site calibration of the IAWPRC activated sludge model, **Water Science and Technology**, 25(6), 105-123.

- Lewis W. M. and Morris D. P., 1986, Toxicity of Nitrite to Fish : a review, **Transactions of the American Fisheries Society**, 115, 183-195

- Martin G., 1979, Le problème de l'azote dans les eaux, **Technique et documentation**, ISBN : 2-85206-047-7

- Oleszkiewicz. J. A., and Berquist. S. A., 1988, Low temperature nitrogen removal in sequencing batch reactors, **Water Research**, 22(9), 1163-1171

- OMS, 2014, Eau, assainissement et santé, Les maladies liées à l'eau, Méthémoglobinémie, http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/methaemoglob/fr/

- Philips S., Laanbroek H. J., Verstraete W., 2002, Origin, causes and effects of increased nitrite concentrations in aqutic environments, **Reviews in Environmental Science and biotechnology 1**, p115-141

- Queinnec I., Ochoa J. C., Vande Wouwer A., and Paul E., 2006, Development and calibration of a nitrification PDE model based on experimental data issued from biofilter treating drinking water, **Biotechnology and Bioengineering**, 94(2), 209-222.

- Raimonet M., Cazier T., Rocher V., Laverman A. M., 2014, Nitrifying kinetics and persistence of nitrite in human-impacted riverine waters, en cours de parution

- Rocher V., Garcia-Gonzales E., Paffoni C., Thomas W, 2011, La production de nitrites lors des la dénitrification des eaux usées : un sujet sensible et complexe ! **L'Eau, l'Industrie, les Nuissances**, 344:80-83

- SIAAP, 2014, Tableau de bord, La qualité de la Seine aujourd'hui,

  http://www.siaap.fr/tableau-de-bord/

- Stein L. Y., Arp D. J., 1998, Loss of ammonia monooxygenase activity in nitrosomonas europaea upon exposure to nitrite, **Appl. Environ. Microbiol**., 64, p4098-4102

- Van Leeuwen F. X., 2000, Safe drinking water : the toxicologist's approach, Food and Chemical Toxicology, 38, Supplement 1, S51-S58

- Vigne E, 2007, Étude et modélisation dynamique d'un procédé par biofiltration en nitrification tertiaire, Thèse de doctorat en génie civil à l'université de Laval

- Vilmin L., Raimonet M., Flipo N., Poulin M., Cazier T., Laverman A., 2013, Determination de paramètres de croissance et de biomasses de communautés microbiennes nitrifiantes Modélisation pluri-annuelle de la dynamique des nitrites en Seine, **rapport PIREN-Seine** phase 6, 29 pages

- Winogradsky S, 1890, Recherches sur les organismes de la nitrification. **Ann Inst Pasteur 1**, 213–231

ANNEXES

Annexe 1 : Mode opératoire des expériences réalisées en 2010 (Le Roch, 2010)

Procédure : Analyse de la capacité nitrifiante des eaux

I Descriptif

L'enjeu de cette analyse est la détermination de la capacité nitrifiante de la Seine. Nous voulons connaitre le devenir des nitrites dans la Seine.
En effet les STEP rejettent des nitrites (produits lors d'une dénitrification partielle). Ces nitrites sont-ils directement nitrifiés une fois le rejet de la STEP ait été oxygéné ou sont-ils nitrifiés bien plus loin en Seine ?

Nous allons prélever deux types d'eau : de l'eau de Seine à l'aval de la station Seine Centre et de l'eau de sortie de dénitrification (sortie du troisième étage) de la station Seine Centre. **Lors de l'intervention sur station il faut impérativement prévenir le PC au 2.12.31 avant de faire le prélèvement.**

II Prélèvement

Prélèvement

Prélever 5L d'eau :

- Pour l'eau de Seine : se mettre dans l'axe (au centre du pont) et prélever l'eau à l'aide d'un sceau.

Attention : le sceau ne doit pas prélever juste l'eau de surface, l'eau du fond ou l'eau des côtés. Il faut arriver à immerger suffisamment le sceau pour faire un prélèvement représentatif.

- Pour l'eau de la STEP : prélever à la sortie du 3eme étage (sortie de dénitrification).

Etiquetage

Une fois le prélèvement effectué il faut étiqueter l'échantillon. Nous appellerons ESE l'eau de la Seine et EDN l'eau de sortie de dénitrification. Il ne faut pas oublier de dater les échantillons. Ex : eau de seine prélevée le 06/03/2010 sera nommée ESE 06/03/10)
2L d'eau sont envoyés au laboratoire DDP pour analyses (DCO, DCOs, DBO_5, MES, NTK, $NO3^-$, NO_2^-, NH_4^+, Pt et PO_4^{3-}).

III Protocole

Matériel

- un réacteur en verre de 2,5L ;
- une sonde pH, $[O_2]_{dissous}$, température ;
- un bulleur ;
- un agitateur magnétique avec barreau aimanté ;
- parafilm ;
- enceinte réfrigérée ;
- kits d'analyses pour NO_3^-, NO_2^-, NH_4^+ ;
- seringues 20mL et cartouches filtrantes 0,45 µm ;
- micropipettes de 5000 µL et 1000 µL ;
- serre-joint ;
- tuyau avec une pince servant pour le prélèvement,

- sac plastique pour les échantillons à température ambiante.

Méthodologie

- Boucher le trou du bas du réacteur en verre.
- Mettre 2,5L d'eau à analyser dans le réacteur.
- Mettre en place les sondes, le bulleur, le barreau aimanté et le tuyau servant pour le prélèvement.
- Doper le milieu en nitrites en ajoutant 20 mL de solution à 625 mg de N/L.
- Mettre à agiter et mettre le bullage. Nous les laisserons en permanence jusqu'à la fin des analyses.
- Mettre le serre-joint après avoir vérifié l'étanchéité du système.
- **Si l'expérience se fait à basse température le réacteur est placé dans le frigo.**

Mettre l'échantillon dans le noir (réfrigérateur ou sac plastique suivant la température).

Une fois cette étape finie prélever de l'eau pour faire les analyses de NO_3^-, NO_2^-, NH_4^+.

Les analyses se feront à 10h, 14h et 16h pendant 48h. Nous commencerons le premier suivi de la concentration en nitrites le lundi à 10h. Ce suivi se finira le mercredi à 10h inclus. Un deuxième suivi sera lancé vers 10h le mercredi pour se terminer par l'analyse du vendredi 10h.

Trois évolutions des nitrites en Seine seront faites à température ambiante et trois seront faites à basse température. Pour l'eau en sortie de dénitrification nous ferons trois suivis à température ambiante.

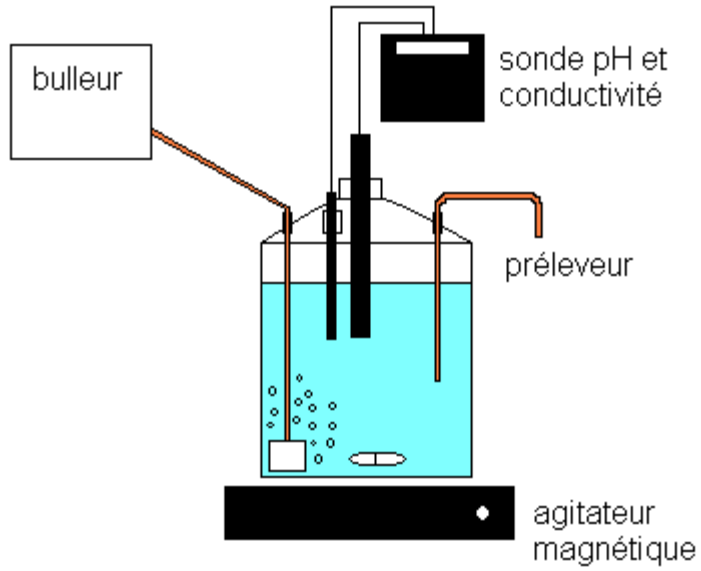

Schéma de la manipulation à température ambiante

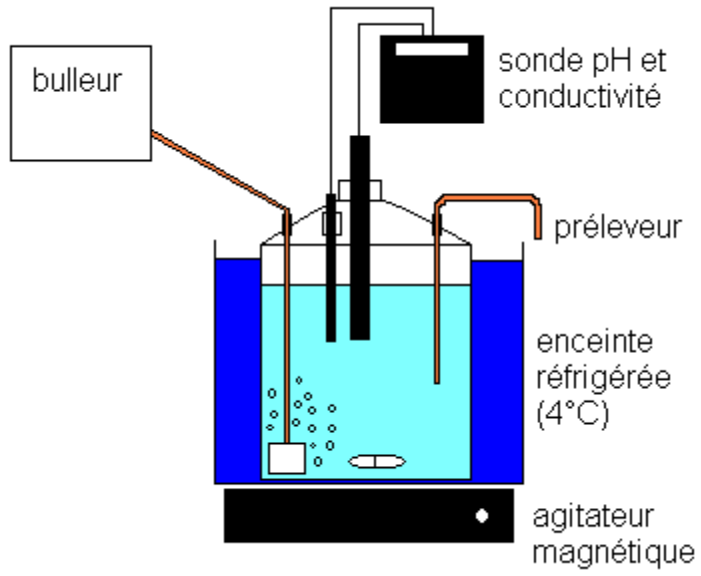

Schéma de la manipulation à basse température

Analyses

Avant de prélever nous relevons la température, le pH et la concentration en oxygène dissous dans le réacteur.

Nous prélevons 10mL-15mL dans la jarre à l'aide du tuyau. Pour cela mettre la seringue au bout, ouvrir la pince et faire un vas et viens avec la seringue pour chasser l'eau stagnante dans le tuyau. Prélever l'eau. La filtrer à l'aide des cartouches filtrantes. Verser l'eau filtrée dans un bécher.

Ammonium :

- prélever 0,5 mL de l'eau filtrée avec une micropipette de 1000 µL.
- placer l'eau dans le tube à essai.
- ajouter une dose de réactif, fermer le tube et agiter vigoureusement jusqu'à dissolution totale du réactif.
- laisser reposer 15 minutes et mesurer.

Nitrate :

- prélever 0,5mL de l'eau filtrée avec une micropipette de 1000 µL.
- placer l'eau dans le tube à essai.
- ajouter 1mL de réactif NO3-1K, boucher le tube et mélanger.

Attention la réaction est exothermique !

- laisser reposer 10 minutes et mesurer.

Nitrite :

- attention la limite de quantification est de 0,7 mg/L. Il faut donc faire une dilution par 10 : mettre 1mL d'eau filtrée dans 9mL d'eau distillée.
- prélever 5mL de la dilution avec une micropipette de 5000 µL.
- placer l'eau dans le tube à essai.
- boucher le tube et agiter vigoureusement jusqu'à dissolution totale du réactif.
- laisser reposer 10 minutes et mesurer.
- pour avoir le résultat nous multiplions par 10 (dilution au dixième).

Ecrire toute les mesures sur la feuille de résultats.

Calcul de la solution mère de NO_2^-

Nous voulons une concentration de 5 mg de N/L. Nous savons que nous ajoutons 20mL de solution mère aux 2,5 L d'eau à analyser.

Dans le réacteur nous avons donc : C(r)=5 mg de N/L et V(r)=2,5L

Le volume de solution mère ajouté dans le réacteur est de V(s)=20 mL= 0,02L
A l'équilibre nous avons C(r)*V(r)=C(s)*V(s).
C(s)=C(r)*V(r)/V(s)= 625 mg de N/L

Pour l'expérience nous avons besoin au maximum de 180 mL de solution mère (9 analyses). Nous choisissons de faire la solution mère dans une fiole jaugée de 250mL.
Nous préparons la solution mère à partir d'une poudre de $NaNO_2$ pure. Nous voulons obtenir 625 mg de N/L. Pour 250 ml nous obtenons 156,25 mg de N.

Nous avons : $N + O_2 \rightarrow NO_2$. La masse molaire de N est de 14 g/mol et celle de NO_2 de 46 g/mol. Nous voulons 156,25 mg de N/L. Nous calculons la masse de NO_2 nécessaire.
Formule : $m(NO_2)/M(NO_2)=m(N)/M(N)$ car les coefficients stœchiométriques sont égaux à 1.
Nous obtenons $m(NO_2)/46 = 156,25/14$. La masse de NO_2 est donc de 513,39 mg.
Nous faisons de même avec la formule : $NO_2 + Na \rightarrow NaNO_2$. Nous obtenons de la même façon $m(NaNO_2)/69 = 513,39/46$.

La masse de $NaNO_2$ à prélever est donc de 770 mg pour obtenir une concentration de 625 mg de N/L.

Annexe 2 : Protocole du dosage des nitrites par colorimétrie

Dosage des nitrites par colorimétrie

1. Réalisation d'une gamme étalon

1. Matériel nécessaire

La première étape du dosage des nitrites est la réalisation de la gamme étalon. Elle est composée de 5 étalons, respectivement à 1, 5, 10, 20 et 30 µM (µmol.L^{-1}).

Matériel nécessaire :
-Eau milliQ (60mL)
-6 Tubes de 15 mL
-Une fiole jaugée de 10 mL
-Cinq pipettes : 10 mL (verte du labo de BM), 1000 µL, 200 µL et 10 µL (chacune avec des embouts correspondants), et une pipette multicanal (Rainin) de 50 µL (embouts spéciaux dans les boites vertes rainin sur l'étagère au-dessus du spectrostar en BM)
-Une balance de précision (balance fermée à gauche dans la salle des balances de chimie)
-La solution stock de nitrite (NO_2^- stabilisée à 1000 mg.L^{-1})
-Une plaque 96 puits
-Un lecteur de plaque 96 puits (pour nous spectrostar nano)
-Un réactif de dosage du nitrite (dans le réfrigérateur au fond à droite en salle de chimie), le réactif de Griess (Cf fiche Promega dans le dossier dropbox\protocols\manip_batch_nitrif). **Réactif dangereux, éviter tout contact avec la peau et toute ingestion**
-Une cuve à prélever pour pipette multicanal (premier placard en haut à droite en BM)

2. Préparation de la solution mère

Inscrire sur 1 tube de 15 mL : « Solution mère à 1mM » avec la date du jour

Préparation de la solution mère à 1 mM (mmol.L^{-1}) qui servira à créer la gamme étalon. Placer la fiole jaugée de 10 mL sur la balance et tarer. Prélever 460 µL de la solution stock de nitrite et verser dans la fiole jaugée. Noter le poids en grammes. Compléter à 10 mL puis noter le poids final en grammes. Les poids notés permettent de calculer précisément la concentration de la solution fille. Le nitrite a une masse molaire de 46 g.mole^{-1}.

$$Conc° \text{ réelle de la solution mère} = \frac{\frac{Poids \text{ des } 460\ \mu L\ (g)}{Poids\ final\ (g)}}{Masse\ molaire\ du\ nitrite\ (\frac{g}{mole})}$$

Le résultat devrait approcher 0.001 M si la préparation et le dosage ont été bien fait, donc 1 mM. Bien homogénéiser la solution dans la fiole jaugée avant de la transférer dans le tube de 15 mL préparé à cet effet.

3. Préparation de la gamme étalon

Notes sur les 5 tubes restant les concentrations des solutions de la gamme étalon avec la date du jour.

Volumes pour préparation de la gamme étalon :

9990 µL d'eau MQ	10 µL de solution mère à 1 mM	→ étalon à	1 µM
9950 µL	50 µL	→	5 µM
9900 µL	100 µL	→	10 µM
9800 µL	200 µL	→	20 µM
9700 µL	300 µL	→	30 µM

Déposer le tube ouvert dans un bécher vide (pour le maintenir droit) puis tarer la balance. Verser le volume d'eau MQ correspondant à l'étalon à préparer grâce à la pipette de 10 mL. Noter le **poids initial**. Bien agiter la solution mère avant de prélever dedans. Prélever le volume de solution mère correspondant à l'étalon en cours de préparation. Noter le **poids final**. Calculer la concentration réelle de l'étalon (ce calcul pourra être fait à la fin pour tous les étalons en même temps). Ce calcul sera effectué en 2 étapes.

$$\%\ massique\ de\ solution\ mère\ dans\ l'étalon = \frac{Poids\ final\ (g) - Poids\ initial\ (g)}{Poids\ final\ (g)}$$

Ce calcul doit donner un résultat de l'ordre de 0.001, 0.005, 0.01, 0.02, et 0.03 pour les étalons, respectivement 1 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM et 30 µM.

$$Conc°\ réelle\ de\ l'étalon\ (mM) = \%\ massique\ de\ l'étalon * conc°\ réelle\ de\ la\ sol°\ mère\ (mM)$$

Si la concentration de la solution mère est proche de 1 mM, ce résultat doit être proche de celui obtenu pour la première étape. Ce résultat est obtenu en mM, donc pour le convertir en µM il faut multiplier par 10^3.

La gamme doit être refaite tous les jours et conservée à 4°C.

4. Préparation du réactif de dosage

Ce réactif est dangereux, il faut éviter tout contact avec la peau et toute ingestion. Ce réactif est préparé par les techniciens du laboratoire de chimie, donc il est peu probable qu'il soit à faire. Il est dans le réfrigérateur au fond à droite dans le labo de chimie.

Dans une fiole jaugée de 1000mL mettre successivement :
10 g de sulfanilamide (amino-4 benzène sulfonamide, $C_6H_8N_2O_2S$)
1 g de N-naphthyl-1 éthylenediamide dichlorohydrate « NED » ($C_{10}H_7NH\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}NH_2$, 2HCl)
800 mL d'eau milliQ
100 mL d'acide phosphorique à 85%

Après dissolution, compléter à 1000 mL avec de l'eau milliQ.

Ce réactif se conserve dans un flacon de verre brun à l'obscurité et au froid (4°C), il est stable plusieurs mois

5. Préparation des échantillons

La gamme étalon est relativement petite, donc pour une bonne précision des mesures la concentration des échantillons doit être comprise entre 1 et 30 µM. Pour le cas des concentrations plus faibles il est difficile de faire quoi que ce soit, mais pour les échantillons dont la concentration est plus forte, il convient de les diluer dans de l'eau MQ. L'idéal est de pouvoir diluer de façon à être au milieu de la gamme au cas où la concentration de l'échantillon est légèrement différente. Pour le cas où la concentration de l'échantillon est inconnue mais attendue élevée, il pourra être déposé plusieurs fois avec des facteurs de dilution différents. Les échantillons prêts, on les dépose dans la plaque 96 puits.

Démarche à suivre

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanc	Blanc	1µM	5µM	10µM	20µM	30µM	1µM	5µM	10µM	20µM	30µM
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Faire le plan de la plaque sur le cahier de labo avant de commencer à déposer.

Déposer 300 µL d'eau MQ en A1 et A2 pour faire le blanc. Déposer 300 µL de chaque étalon en duplicat à la suite des blancs d'A3 à A12. Commencer à déposer les échantillons à partir de B1, à raison de 300 µL d'échantillon par puits. Aller chercher le réactif de dosage de nitrite et en verser dans la cuve à prélever pour pipette multicanal. Déposer 30 µL de réactif nitrite dans chaque puits de la plaque 96 puits à l'aide de la pipette multicanal. Placer la plaque à l'obscurité (dans un tiroir) et attendre les 20 minutes de coloration.

6. Lecture des concentrations

La plaque 96 puits est disposée sur le lecteur de plaque le coin A1 et haut à gauche. Ouvrir le logiciel « control » du spectrostar nano. Ensuite exécuter le protocole « nitrites » (sans avoir oublié de vérifier le layout et de changer le nom de la manip et du manipulateur : click droit « edit protocol » & « change IDs »). La lecture de l'absorbance se fait à 540 nm. Les résultats sortent sur le logiciel « Mars » qui sert à analyser les résultats du spectrostar. Cliquer sur l'onglet « table view » puis exporter vers excel (onglet présent pour l'export). Ajouter les concentrations réelles des étalons à coté de leur absorbance. Tracer la courbe de calibration : « nuage de point » puis click droit « ajouter une courbe de tendance ». Forcer le passage par 0, ajouter l'équation de la droite et le coefficient de détermination. Se servir

ensuite de l'équation de la droite pour faire la relation entre l'absorbance de chaque échantillon et sa concentration. Attention à ne pas oublier le facteur de dilution éventuel.

RESUME

La Seine est un fleuve fortement anthropisé et est directement impacté par l'agglomération parisienne. Conscient de la fragilité de ce fleuve, le SIAAP réalise, depuis plus de 20 ans, le suivi hebdomadaire de la qualité physico-chimique de l'eau le long de la Seine.

En parallèle de cette auto-surveillance, il a mis en place une étroite collaboration avec le LGE dans le cadre du programme de recherche PIREN-Seine où il s'agit d'exercer un suivi à haute fréquence de la Seine. Ce projet nommé CarboSeine compte aujourd'hui trois stations in-situ autonomes multi-paramètres à l'aval de l'agglomération parisienne (Andrésy, Bougival et Suresnes). Ce suivi va permettre de suivre en continu des paramètres mis en jeu lors des processus biogéochimique. Ces informations vont donc permettre de mieux comprendre ces processus. Une sonde mesurant les composés azotés (ammonium, nitrites, nitrates) a été testée en laboratoire et en reconstituant des conditions réelles avant d'envisager de la déployer en Seine. Les tests ont montré que cette sonde était fonctionnelle et sera testée en Seine en fin d'année 2014.

Une deuxième étude en collaboration avec le PIREN-Seine a permis d'étudier les cinétiques « in situ » de la nitrification en Seine. Cette étude a permis de déterminer ces cinétiques sur 3 sites différents en aval de l'agglomération parisienne (un en amont de SAV (Asnières), les rejets de SAV, et en aval de SAV (Poissy). Les données ne donnent pas des résultats très probants. Les cinétiques de nitrosation et nitratation étant faibles, la variation de concentration en nitrites sur 24h est peu marquée alors que l'erreur de la mesure de concentration peut être importante. Cependant, cette étude a permis d'établir un mode opératoire qui permettra un traitements de données futures et de déterminer plusieurs paramètres importants pour mieux comprendre la dynamique des composés azotés et leur devenir en Seine. Cela sera utile et contribuera à améliorer la prédiction des concentrations en nitrites, nitrates et ammonium en Seine.

Mots-clés : Qualité de l'eau, Seine, Azote, Sonde, Mesure en continu, Cinétiques, Nitrification